

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Genetika, molekulární biologie a virologie



Bc. Dominika Kadlečková

Bazální membrána a úloha matrix metaloproteináz v průběhu embryonálního hojení ran
Basement membrane and the role of matrix metalloproteinases during embryonic wound healing

Diplomová práce

Vedoucí práce: Mgr. Radek Šindelka, PhD.
Laboratoř genové exprese
Biotechnologický ústav AV ČR, v.v.i.

Praha, 2019

Poděkování

Ráda bych poděkovala svému vedoucímu práce Mgr. Radku Šindelkovi, PhD. Vážím si každé jeho cenné rady, trpělivosti, vedení a především příležitosti, býti členem Laboratoře genové exprese. Poděkování si zaslouží také všichni ostatní z laboratoře za přátelské prostředí, pomoc při provádění experimentů a sepisování práce. Také chci poděkovat rodině a nejbližším, že mě po celou dobu studia podporovali.

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval/a samostatně a že jsem uvedl/a všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 29.04.2019

Podpis

Abstrakt

Proces hojení je atraktivním tématem biologie a medicíny. Existují dva typy mechanismu zacelování ran - u embryí a u dospělých jedinců. V případě embryonálního hojení je celý děj podstatně zjednodušen a zrychlen. Nežádoucí zápalová reakce, vyskytující se u dospělců, je v podstatě eliminována a rána je zhojena bez jizev. Lepší porozumění embryonálního hojení by mohlo vést k efektivnější léčbě úrazů, popálenin a chronických ran u lidí. Velmi důležité je studium molekulárních mechanismů procesu hojení také v souvislosti s pochopením regulace rakovinného bujení.

Hojení ran připomíná v mnoha ohledech embryonální vývoj. U toho jsou klíčové tělní osy pro prostorově regulovanou aktivaci vývojově důležitých genů. V této práci byla testována hypotéza, že i orientace vedeného zranění je důležitá pro polaritu a motilitu buněk a při zavírání rány hraje roli, zda je zranění vertikální či horizontální. Významnou částí hojení i rozvoje rakoviny je degradace bazální membrány (BM) a extracelulární matrix (ECM). Ta je spuštěna koordinovaným působením několika tříd enzymů. V této práci byly studovány matrix metaloproteinázy (MMP) a jejich úloha v embryonálním hojení ran. Jedná se o enzymy důležité nejen při hojení, ale i v rozvoji rakoviny. U embryí drápatky vodní (*Xenopus laevis*) byly na základě RT-qPCR a RNA-Seq vybrány *mmp7*, *8*, *9*, *11*, jejichž aktivita roste v pozdějších fázích hojení (po 3 a 6 hodinách po poranění). Tedy tehdy, kdy je na povrchu rána již uzavřena a dochází k vnitřní remodelaci tkáně. Byl použit inhibitor D609 (tricyklodekan-9-yl-xanthát), který nespecificky inhibuje MMP a negativně působí na BM, u které pak nedochází ke správné syntéze kolagenu IV. Jeho aplikace vedla k zablokování procesu hojení. Účinky inhibitoru na proteiny ECM byly studovány imunohistochemicky (vizualizace kolagenu, lamininu, aktinu) i na úrovni genové exprese (vybrané *mmp*) pomocí RT-qPCR a *in situ* hybridizace. Mimo to byla v práci také ověřena tvorba aktino-myosinového komplexu při zavírání rány.

Získané výsledky naznačují jen jeden způsob zavírání rány (efekt „zipu“) bez vlivu orientace poranění. Pomocí inhibitoru D609 byla prokázána klíčová úloha BM a proteinů ECM (kolagenu a lamininu) při hojení. Výsledky také nastínily důležitost vybraných MMP v pozdějších fázích hojení a nutnost správného formování BM pro dokončení procesu remodelace.

Klíčová slova: *Xenopus laevis*, embryonální hojení ran, matrix metaloproteinázy, MMP, bazální membrána, BM

Abstract

The healing process is an attractive topic in biology and medicine. There are two types of wound healing - in embryos and in adults. In the case of embryonic wound healing the whole process is simplified and accelerated. An inflammatory reaction typical for adult healing is eliminated and the wound is healed without scars. Better understanding of embryonic wound healing could lead to more effective treatment of injuries, burns and chronic wounds in human population. The studying of molecular mechanisms in the healing process is also meaningful in the context of understanding the cancer regulation.

The wound healing could be compared with embryonic development in many ways. The body's axes are essential for a spatial activation of genes involved in development. Our hypothesis was that the axis are also important for wound healing. It has been suggested that the cell's polarity and motility depends whether the wound is vertical or horizontal. There are also connections between wound healing and cancer development. One of them is the degradation of the basement membrane (BM) and extracellular matrix (ECM). The process of degradation is catalyzed by the coordinated action of several classes of enzymes. Some of them - matrix metalloproteinases (MMP) and their role in embryonic wound healing have been studied in this work. These enzymes are important not only for healing, but also for the cancer development. A few *mmp7, 8, 9, 11* of *Xenopus laevis*, have been chosen for studying based on RT-qPCR and RNA-Seq. The expression of such genes increases in later stages of healing (3 or 6 hours after injury), that means when the wound surface is closed and internal tissue remodeling occurs. An inhibitor D609 (tricyclodecan-9-yl xanthate) was used for non-specific inhibition MMP. This chemical also inhibits collagen IV biosynthesis and negatively affects the BM. Its application led to the blockage of the healing process. The inhibitors' effects have been studied immunohistochemically on ECM proteins (visualization of collagen, laminin, actin) and on the level of gene expression (selected *mmp*) by RT-qPCR and *in situ* hybridization. In this thesis, there has also been verified the formation of the actin-myosin cables during wound closure.

Our results indicate only one way of wound closing (the "zipper" effect) without the effect of injury's orientation. A key role of BM and proteins of ECM (collagens and laminins) has been demonstrated by the usage of a D609. Results also suggest the importance of selected MMPs in later stages of healing and a need for proper basement membrane formation to complete the remodeling process.

Klíčová slova: *Xenopus laevis*, embryonic wound healing, matrix metalloproteinases, MMP, basement membrane, BM

1.	Úvod	9
1.1.	Proces hojení rány	10
1.1.1.	Hojení rány dospělého jedince.....	10
1.1.1.1.	Hemostáze	11
1.1.1.2.	Zánět.....	11
1.1.1.3.	Proliferace.....	14
1.1.1.4.	Remodelace	15
1.1.2.	Hojení ran embryí	16
1.1.2.1.	Modelový organismus <i>Xenopus laevis</i>	19
1.1.3.	Molekulární regulace hojení	20
1.1.3.1.	Regulace dospělého hojení	20
1.1.3.2.	Regulace embryonálního hojení.....	21
1.1.4.	Matrix metaloproteinázy	22
1.1.5.	Bazální membrána	26
2.	Cíle	28
3.	Materiál a metody.....	29
3.1.	Embrya	29
3.2.	Poranění.....	29
3.3.	Chemická inhibice bazální membrány	29
3.3.1.	Inhibice hojení	30
3.3.2.	Inhibice vývoje bazální membrány	30
3.4.	Imunohistochemie.....	30
3.4.1.	Aktin.....	30
3.4.2.	Laminin	31
3.4.3.	Kolagen	31
3.5.	Časová analýza genové exprese.....	32
3.5.1.	Sběr tkáně.....	32
3.5.2.	Izolace RNA fenol-chloroformovou extrakcí	32

3.5.3.	Reverzní transkripce.....	33
3.5.4.	Kvantitativní PCR v reálném čase (qPCR).....	33
3.6.	Prostorová analýza genové exprese	35
3.6.1.	Příprava RNA próby a memGFP	35
3.6.2	Fixace	37
3.6.3	<i>In situ</i> hybridizace.....	37
3.7.	Chování buněk v okolí rány	38
4.	Výsledky	39
4.1.	Optimalizace koncentrace inhibitoru D609	39
4.2.1.	Aktino-myosinový komplex	40
4.2.2.	Morfologie buněk při okraji rány	41
4.3.	Genová exprese vybraných <i>mmp</i>	42
4.3.1.	Testování primerů pro qPCR a prób pro <i>in situ</i> hybridizaci pro jednotlivé <i>mmp</i>	42
4.3.2.	Srovnání RNA-Seq a qPCR vybraných <i>mmp</i>	43
4.3.3.	Genová exprese <i>mmp</i> u inhibovaných a kontrolních embryí.....	46
4.4.	Bazální membrána při embryonálním hojení	49
4.4.1.	Kolagenová vrstva.....	49
4.4.2.	Lamininová vrstva.....	50
5.	Diskuze	54
6.	Shrnutí a závěr.....	60
7.	Literatura.....	61
8.	Přílohy.....	71
3.7	Příloha 1: Používané primery pro RT-qPCR analýzu navrhnuté na rozhraní intron/exon pomocí Primer-BLAST	71
3.8	Příloha 2: Testovací qPCR s geny <i>rfl1</i> a <i>spike</i>	72
3.9	Příloha 3: Záznam hojení v reálném čase (přiložené CD).....	72

Seznam zkratek

BM	bazální membrána
BMP	kostní morfogenetický protein
BSA	hovězí sérový albumin
Ca ²⁺	vápenaté ionty
CaCl ₂	chlorid vápenatý
Cdc42	cell division control protein 42 homolog, kontrolní protein buněčného dělení 42
CHAPS	3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonát hydrát
D609	tricyklodekan-9-yl-xanthát
dH ₂ O	deionizovaná voda
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
ECM	extracelulární matrix
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
EGF	epidermální růstový faktor
EMT	epiteliálně-mezenchymální tranzice
ERK	extracelulárně regulovaná kináza
EtOH	ethanol
FAK	fokální adhezivní kináza
FGF	fibroblastový růstový faktor
H ₂ O ₂	peroxid vodíku
HEPES	2-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperaziny]-ethanesulfonová kyselina
HGF	hepatocytární růstový faktor
HH	hedgehog
HMGB1	protein s vysokou pohyblivostí B1
HSS	high salt solution
IFN- γ	interferon gamma
IGF-1	insulinu podobný růstový faktor 1
IL-1	interleukin-1
IL-1 β	interleukin-1 beta
IL-2	interleukin-2
IL-4	interleukin-4
IL-5	interleukin-5
IL-6	interleukin-6
IL-8	interleukin-8
IL-10	interleukin-10
KGF-1	keratinocytový růstový faktor-1
KGF-2	keratinocytový růstový faktor-2
LiCl	chlorid litný
MAB	maleic acid buffer
MAPK	mitogenem aktivovaná proteinkináza
MBS	modified Barths saline
mem-GFP	membránový zelený fluorescenční protein
MgCl ₂	chlorid hořečnatý
MgSO ₄	síran hořečnatý
MMP	matrix metaloproteinázy
MOPS	3-(N-morfolino)-propansulfonová kyselina
mRNA	mediátorová RNA

NaCl	chlorid sodný
NaOH	hydroxid sodný
NFW	nuclease free water
NF- κ B	nukleární faktor kappa
NICD	Notch intracellular domain
NO	oxid dusnatý
PC-PLC	fosfatidylcholin specifické fosfolipázy
PBS	solný roztok fospátového pufru
PBT	solný roztok fospátového pufru+Tween 20x
PDGF	od trombocytů odvozený růstový faktor
PF4	trombocytový faktor 4
PFA	paraformaldehyd
PGE2	prostaglandin E2
PI3K	fosfatidylinositol-3-kináza
PIP3	fosfatidylinositol-(3,4,5)-trisfospát
PTCH	Patched
qPCR	kvantitativní polymerázová řetězová reakce v reálném čase
Rac1	Ras-příbuzný C3 botulotoxin substrát 1
RhoA	Ras homolog gene family, member A
RNA	ribonukleová kyselina
RNA-Seq	RNA sekvenování
ROS	reaktivní oxidativní radikály
RT	reverzní transkripce
RT-qPCR	kvantitativní PCR spojená s reverzní transkripcí
SMO	Smoothened
SSC	solný roztok citrátu sodného
TAE	Tris-acetát-EDTA
TE puf	Tris/EDTA
TGF- α	transformační růstový faktor alfa
TGF- β 1	transformační růstový faktor beta 1
TGF- β 2	transformační růstový faktor beta 2
TGF- β 3	transformační růstový faktor beta 3
TIMP	tkáňové inhibitory metaloproteináz
TNF- α	faktor nádorové nekrózy alfa
t-PA	tkáňový inhibitor plasminogenu
TRIM	1-2-trifluoromethylfenyl imidazol
Tris	tris-(hydroxymethyl)-aminometan
uPA	urokináza
u-PAR	urokinázový receptor
VEGF	vaskulární endoteliální růstový faktor
Wnt	wingless-INT
Zn ²⁺	zinečnaté ionty

1. Úvod

Poznatky spojené s hojením ran si lidé předávají již několik tisíc let. Dříve se hojení zranění zpravidla neobešlo bez komplikací, často se do něj dostávala špína, rána se zanítla a nedocházelo k řádnému zacelení. Důležitým krokem k úspěšné léčbě bylo používání desinfekce, ke které se přistoupilo v 19. století. Medicína i věda se od té doby znatelně posunula, bohužel i tak nejsme schopni při rozsáhlých poškozeních tkáně hojení urychlit a ránu zacelit bez trvalých následků.

Zranění se hojí dvojím způsobem – reparací a regenerací. Během reparace je zničená tkáň kompenzována jinou a vznikají nevzhledné jizvy. V případě regenerace je naopak narušená tkáň nahrazena zcela identickou tkání. Taková schopnost regenerace je pozorována u embryonálního hojení. Bohužel věkem tato schopnost klesá a tím i efektivita hojení. Z tohoto důvodu se studium embryonálního hojení stává klíčem k pochopení efektivnějšího hojení ran.

Tato práce se zabývá embryonálním hojením ran na modelovém organismu *Xenopus laevis* (drápatka vodní). Hojení bylo studováno na buněčné i molekulární úrovni. Konkrétněji se práce zabývá matrix metaloproteinázami (MMP), což jsou enzymy, důležité ve fázi reepitelizace a remodelace tkáně. Lepší porozumění procesu embryonálního hojení by mělo vést k efektivnější léčbě úrazů, popálenin a chronických ran u lidí. Velmi zajímavým překryvem ve studiu molekulárních mechanismů hojení je podobnost s regulací rakovinného bujení.

1.1. Proces hojení rány

Hojení je dynamický, komplexní proces, zahrnující koordinované interakce mezi imunitním a biologickým systémem. Je znám u všech studovaných organismů od bakterií (Hambleton 1971), kvasinek (Levin 2005), prvoků (Szubinska 1971) a rostlin (Volkman et Baluška 1999) až po složitější zvířata. Veškeré kroky během hojení jsou pečlivě a přesně regulovány. U vyšších organismů se jedná o proces, ve kterém je zahrnuto mnoho buněčných subtypů, jako jsou fibroblasty, keratinocyty, endotelové buňky či zánětlivé buňky (Caley et al. 2015). Tyto subtypy se objevují v ráně v jednotlivých fázích hojení, které probíhají organizovaně, plynule na sebe navazují a zároveň se prolínají. Hojení se zpravidla rozděluje do dvou rozdílně probíhajících typů – hojení u embryí a dospělců.

1.1.1. Hojení rány dospělého jedince

Hojení ran dospělých zahrnuje dobře uspořádané série událostí, které vedou k opravě poškozených tkání. Většinou je rozdělováno do čtyř fází: hemostáze, zánět, proliferace a nakonec remodelace tkáně, která je ukončena zformováním jizvy (**Tab. 1**). Tyto čtyři procesy jsou regulovány širokým spektrem molekul, zahrnujících jak extracelulární matrix (ECM), tak integriny, růstové faktory či enzymy (Broughton 2nd et al. 2006; Velnar et al. 2009; Caley et al. 2015). Přerušeni nebo prodloužení jednotlivých fází, může vést ke zpomalení hojení či k nehojící se chronické ráně (Thiruvoth et al. 2015). Hojení ran může být negativně ovlivněno i mnoha exogenními faktory zahrnující choroby jako je *diabetes*, selhání ledvin, podvýživa nebo důsledky kouření. V přítomnosti těchto faktorů se rány nemohou adekvátně hojit a dochází k tvorbě chronických ran (Guo et DiPietro 2010).

Tab. 1: Série procesů u normálně probíhajícího hojení rány (Guo et DiPietro 2010)

Fáze	Buněčná a fyziologická událost
Hemostáze	Vazokonstrikce
	Shlukování destiček, degranulace, sraženina
Zánět	Infiltrace neutrofilů
	Infiltrace monocytů a diferenciace na makrofágy
	Infiltrace lymfocytů
Proliferace	Reepitelizace
	Angiogeneze
	Formace ECM
Remodelace	Remodelace kolagenu
	Cévní maturace

1.1.1.1. Hemostáze

Prvotní fáze obvykle trvá pár sekund, maximálně minut. Bezprostředně po zranění je působením tromboxanu a prostaglandinů zahájena vazokonstrikce a tvorba krevní sraženiny. Cílem je omezení ztráty krve a zabránění vniknutí cizorodých patogenů. Krevní destičky se navazují ke kolagenu a dochází k jejich agregaci (Furie et Furie 2008). Tímto je vytvořena počáteční hemostatická zátka a dochází k uvolnění obsahu granulí trombocytů. Po zastavení krvácení jsou chemotaktické faktory a vazoaktivní mediátory uvolňovány zraněným epitelem a buňkami ve sraženině (Moulin et al. 1998). V tkáni se aktivuje protrombin, který se přeměňuje na trombin. Ten následně štěpí fibrinogen, čímž vzniká fibrin. Spolu s destičkami a plasmovým fibronectinem vytváří fibrin sraženinu (Furie et Furie 2008). Výsledná sraženina nejen zaplní otvor, kontroluje krvácení, koncentruje a váže růstové faktory, ale slouží i jako lešení pro další kroky hojení rány (Kurkinen et al. 1980). Sraženina a poraněná tkáň uvolňují prozánětlivé cytokiny a růstové faktory například transformační růstový faktor $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$), od trombocytů odvozený růstový faktor (PDGF), fibroblastový růstový faktor (FGF), epidermální růstový faktor (EGF), trombocytový faktor 4 (PF4), leukotrien B4 nebo interleukin 1 (IL-1). Jakmile je krvácení pod kontrolou, dochází k migraci zánětlivých buněk do rány (chemotaxe), čímž začíná následující zánětlivá fáze (Broughton 2nd et al. 2006).

1.1.1.2. Zánět

Zánětlivý proces zahrnuje koordinované působení neutrofilů, makrofágů a lymfocytů. Každý z těchto typů zánětlivých buněk uvolňuje koktejly růstových faktorů a cytokinů, které se překrývají (uvedeno v **Tab. 2** a **Obr. 1**). Ty fungují jako signály pro opravu tkáně, pro různé chování buněk při procesu zacelování rány a jako zesilovače zánětlivé reakce, což vede k akumulaci neutrofilů, makrofágů a žírných buněk v místě zánětu (Martin et Leibovich 2005). Již několik let je známo, že zánět není jen ničivá destrukce vlastních tkání, ale řízený proces uspořádaných reakcí, obsahující „checkpointy“ (Nathan 2002).

Mobilizace leukocytů z krevního oběhu do rány začíná takřka ihned. Při hojení pokožky jsou leukocyty hlavní složky časně zánětlivé odpovědi. Nejedná se pouze o buňky, které bojují proti napadení patogeny, ale podílejí se také na degradaci poškozené tkáně a tvorbě tkání nových. Převážně se jedná o polymorfonukleární leukocyty (neutrofily), zachycené v krevní sraženině (Ross et Odland 1968). Neutrofily se připojují na ECM vazbou na jejich integrinové receptory. Jiné neutrofily, které jsou přitahovány k dalším místům, mohou snadno přecházet přes matrix, komplexním působením proteináz včetně MMP za vzniku volných radikálů

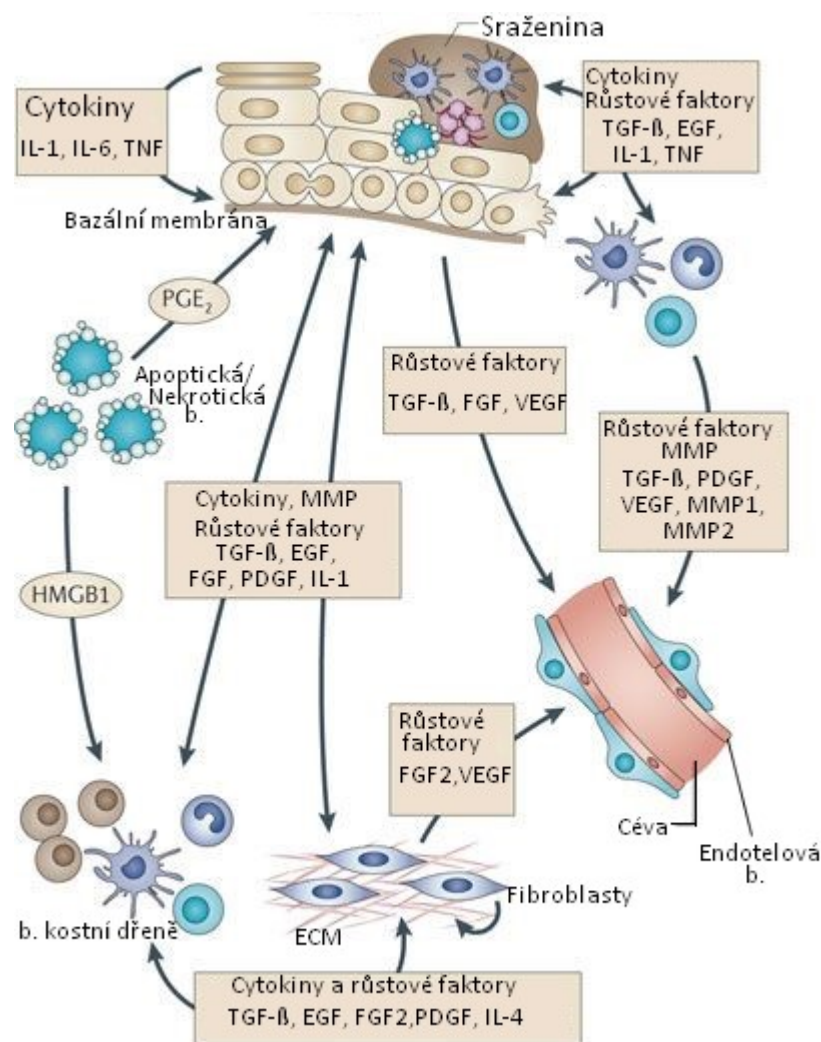
kyslíku, pro eliminaci bakterií a vyčištění ECM (Broughton 2nd et al. 2006). Souběžně s hromaděním neutrofilů vstupují do rány i cirkulující monocyty, které se působením IFN- γ (interferon gama) uvolněného z fibroblastů, diferencují na zralé tkáňové makrofágy (Koh et DiPietro 2011; Broughton 2nd et al. 2006). Další makrofágy jsou do rány přitahovány chemoatraktanty produkovanými krevními destičkami a krevní sraženinou (Broughton 2nd et al. 2006). Makrofágy pomocí fagocytózy odstraňují apoptotické neutrofile, tvořící dominantní část hnisu, což vede k odstranění chemokinů z oblasti zánětu a zabránění dalšímu hromaděni leukocytů (Koh et DiPietro 2011). Zároveň produkují růstové faktory TGF- β , TGF- α (transformační růstový faktor α), TNF- α (faktor nádorové nekrózy α), EGF, PDGF, VEGF (vaskulární endoteliální růstový faktor) a IL-1. Pomocí těchto faktorů zprostředkovávají angiogenezi, fibroplazii a syntézu NO (oxid dusnatý) (Guo et DiPietro 2010; Witte et Barbul 2002). Tyto faktory také aktivují a přitahují buňky endotelu, fibroblasty, keratinocyty, způsobují buněčnou proliferaci a syntézu ECM a umožňují tak hojení rány. Poškozená ECM je současně čištěna MMP, které jsou produkovány keratinocyty, fibroblasty, monocyty a makrofágy jako odpověď na TNF- α . Tyto enzymy odstraňují zbytky zánětlivého prostředí a umožňují snadnější migraci buněk účastnících se hojení přes ECM. Zvyšuje se i počet žírných buněk, které přetrvávají až do pozdní zánětlivé fáze (Artuc et al. 1999; Koh et DiPietro 2011), kdy se objevují T lymfocyty. Ty mohou ovlivňovat konečné dohojení a remodelaci rány (Barbul et al. 1989).

Některé studie naznačují, že fenotyp makrofágů by mohl být rozhodující a kritický při patogenezi chronických ran. Například u myšího modelu bylo prokázáno, že zvýšené množství železa v makrofázích vede k vytvoření dominantní populace prozánětlivých makrofágů M1, což vyústilo v narušené hojení (Sindrilaru et al. 2011).

Tab. 2: Zánětlivé buňky, jejich funkce a mediátory uvolňované při opravě tkání (Eming et al. 2007)

Typ buňky	Funkce	Mediátory
Neutrofil	Fagocytóza infekčních agens	ROS, kationtové antibakteriální peptidy, eikosanoidy, proteinázy
	Amplifikace zánětlivé odpovědi	TNF- α , IL-1 β , IL-6
	Aktivace makrofágů	
	Stimulace opravných mechanismů	VEGF, IL-8
Makrofág	Fagocytóza neutrofilů a degradace tkáně	
	Amplifikace zánětlivé odpovědi	TNF- α , IL-1 β , IL-6
	Protizánětlivá funkce	IL-10, TGF- β 1
	Stimulace opravných mechanismů (angiogeneze a fibroplazie)	PDGF, VEGF, FGF, TGF- α , TGF- β
	Fibrolýza	t-PA, uPA, u-PAR
Žírné buňky	Kontrola kapilární permeability	Histamin
	Kontrola influxu neutrofilů	Chymáza, tryptáza
	Regulace tkáňové remodelace	
T buňky	Regulace tkáňové remodelace	CD40 ligand; IL-2, TNF- α /IL-4, -5, -10
$\gamma\delta$ T buňky	Proliferace a eliminace zničených keratinocytů, diferenciace	FGF-7, FGF-10, IGF-1,

IL-1 β – Interleukin 1 β ; IL-6 – Interleukin 6; IL-10 – Interleukin 10; t-PA– tkáňový aktivátor plasminogenu; uPA – urokináza; u-PAR – urokinázový receptor; IL-2 – Interleukin 2; IL-4 – Interleukin 4; IL-5 – Interleukin 5; IGF-1 – Insulinu podobný růstový faktor 1



Obr. 1 Mikroprostředí hojící se rány

Hojení je souhrn dynamických událostí, vyžadující interakce široké škály různých buněk a chemoatraktantů. Nejprve dochází k aktivaci krevních destiček, vytvoření sraženiny a zastavení krvácení. Trombocyty uvolňují širokou škálu růstových faktorů a chemoatraktantů, vedoucích k aktivaci buněk imunitního systému. Aktivaci fibroblastů prostřednictvím transformačního růstového faktoru- β (TGF- β) a růstového faktoru odvozeného od trombocytů (PDGF) dojde k vytvoření přechodné granulační tkáně. Aktivované fibroblasty mohou stimulovat angiogenezi a další nábor buněk imunitního systému. Nekrotické a apoptotické buňky uvolňují protein s vysokou pohyblivostí B1 (HMGB1) a prostaglandin E2 (PGE2), které mohou stimulovat proliferaci epidermálních buněk. Podobné signální dráhy jsou aktivovány při rozvoji nádoru (upraveno podle Arwert et al. 2012).

1.1.1.3. Proliferace

Ve fázi proliferace je důležité zvýšení množství fibroblastů, přestavba ECM, tvorba nových krevních cév a opětovná epitelizace poškozené tkáně. Proliferace se částečně překrývá se zánětlivou fází. Obvykle nastává 2 dny po poranění a trvá až 3 týdny (Thiruvoth et al. 2015). Přechod mezi zánětlivou a proliferační fází může být označen za jeden z klíčových, jelikož abnormální prodloužení zánětlivé fáze často vede k narušení celého procesu hojení (Landén et al. 2016).

Makrofágy a žírné buňky uvolňují růstové faktory, které stimulují aktivaci fibroblastů. Fibroblasty se v této fázi hojení stávají klíčovým a převládajícím typem buněk. Dochází k jejich proliferaci, produkují strukturní protein kolagen, glykoproteiny (laminin, fibronectin), proteoglykany (syndekan), fibronectin a glykosaminoglykany (hyaluronan), které jsou důležité pro tvorbu nové ECM (Thiruvoth et al. 2015; Schultz et Wysocki 2009). Zároveň nastává produkce proteináz (např. MMP), které degradují prozatímní ECM, vytvořenou v hemostatické fázi. Vlivem TNF- α dochází k tvorbě granulační tkáně, která je tvořena převážně kolagenem III (Broughton 2nd et al. 2006). Granulační tkáň poskytuje kostru pro další migraci a adhezi buněk, migrujících do rány. Fibroblasty syntetizují a produkují keratinocytové růstové faktory KGF-1, KGF-2 a dále IL-6. Ty stimulují sousední keratinocyty k migraci do oblasti poranění, kde proliferují, diferencují a následně může dojít k reepitelizaci (Smola et al. 1993).

Během formace nové granulační tkáně je nutným krokem obnova krevního zásobení a výstavba nových cév (angiogeneze). To je iniciováno růstovými faktory, jako je například VEGF, PDGF, FGF. Důležitý je i proteolytický enzym trombin. Ten naruší bazální laminu, a aktivuje tak endotelové buňky existujících cév, které migrují a následně proliferují v místě angiogenního stimulu (Landén et al. 2016).

Vlivem TGF- β fibroblasty začnou syntetizovat kolagen typu I, zvýší se produkce inhibitorů MMP a dojde ke zvýšení produkce adhezivních proteinů (Yang et al. 1997; Landén et al. 2016). Dochází ke kontrakci rány a k transformaci fibroblastů na myofibroblasty a dochází k epitelizaci a remodelaci (Broughton 2nd et al. 2006; Welch et al. 1990). Po obnovení epiteliální vrstvy vylučují keratinocyty a fibroblasty kolagen IV podporující vznik BM (Wojtowicz et al. 2014).

1.1.1.4. Remodelace

Přestavba ECM vede k přeměně granulační tkáně na jizvy. Jde o proces, ve kterém jsou rozhodující MMP v kontinuální degradaci a určují i do jaké míry proběhne syntéza nových kolagenových vláken (Parks 1999; Singer et Clark 1999). Ačkoliv jizvy časem zesílí, kolagen v jizvě už nikdy není shodný s kolagenem v nepoškozené tkáni (von Zuijlen et al. 2003).

Kontrolovaná produkce proteináz je rozhodující pro normální hojení ran. Chronicky zvýšené hladiny určitých MMP mohou vést k nadměrné degradaci matrix, což má za následek narušení hojení ran (Wysocki et al. 1993; Muller et al. 2008).

MMP se tak zdají být klíčovými regulátory mnoha aspektů při opravě tkáně. Další studium těchto enzymů by tak mohlo posunout znalost v hojení ran a poskytnout tak další možnosti terapií.

1.1.2. Hojení ran embryí

Poranění embryí se velmi rychle a dokonale zacelují bez tvorby jizev. Tato vysoká schopnost hojení a regenerace byla v případě savců pozorována u plodů myši, potkanů, prasat, opic i lidí (Colwell et al. 2005). Vysoká regenerační schopnost se bohužel vytrácí společně s dalším vývojem. Například embryonální pokožka u lidí již kolem 16. týdne těhotenství obsahuje některé složky dospělého jedince (bazální vrstva, potní žlázy, vlasové folikuly atd.). Po 24. týdnu těhotenství je schopnost hojení tkáně bez jizev ztracena. V tomto období je vývoj fetální kůže charakterizován rychlým růstem a dozráváním (Lane 1986). U potkanů tato ztráta nastává mezi 16. a 20. dnem gestace (Cass et al. 1997).

Během embryonálního hojení ran vytvoří buňky na okraji poranění kontraktilní struktury známé jako aktino-myosinový komplex, které slouží k přitahování porilehlých stran poranění k sobě (Martin et Lewis 1992a). Buňky při okraji rány kromě těchto struktur vytvářejí také dynamické aktinové protruze, napomáhající uzavírání rány (Davidson et al. 2002). Analýza aktinových cytoskeletových struktur, vznikajících během opravy tkáně, odhalila podobnost s některými morfogenetickými procesy, které se vyskytují během normálního embryonálního vývoje (Martin 2004). Tato podobnost naznačuje, že hojení ran může být spojováno s opětovnou aktivací morfogenetických procesů během gastrulace (Li et al. 2013).

Ačkoliv přesné mechanismy hojení ran u embryí nejsou dosud známy, předpokládá se, že hojení bez jizev je způsobeno rozdíly v ECM, zánětlivou odpovědí, buněčnými mediátory, rozdílnou genovou expresí a funkcí kmenových buněk (Beanes et al. 2001; Soo et al. 2003, 2000; Larson et al. 2010).

Jedinečné komponenty fetální ECM mohou být částečně zodpovědné za dokonalé hojení ran. Fetální ECM se liší od ECM dospělých ve složení kolagenu, obsahem kyseliny hyaluronové a modulátorů ECM (MMP). Jelikož je syntéza a remodelace ECM nezbytná při hojení ran, mnoho studií se zabývalo rozdíly u fibroblastů (Gosiewska et al. 2001; Lorenz a Adzick 1993; Chen et al. 1989; Mast et al. 1993, 1991).

Důležitou součástí ECM jsou kolageny, ve kterých také nacházíme nejednotnost. Dospělé myofibroblasty vylučují ve vysoké míře kolagen typu I, který je pak hlavním komponentem

v dospělé matrix, a proto je důležitý v procesu jizvení. Naopak embryonální fibroblasty syntetizují méně kolagenu I a mnohem více kolagenu III a IV (Degen a Gourdie 2012; Cheng et al. 2010).

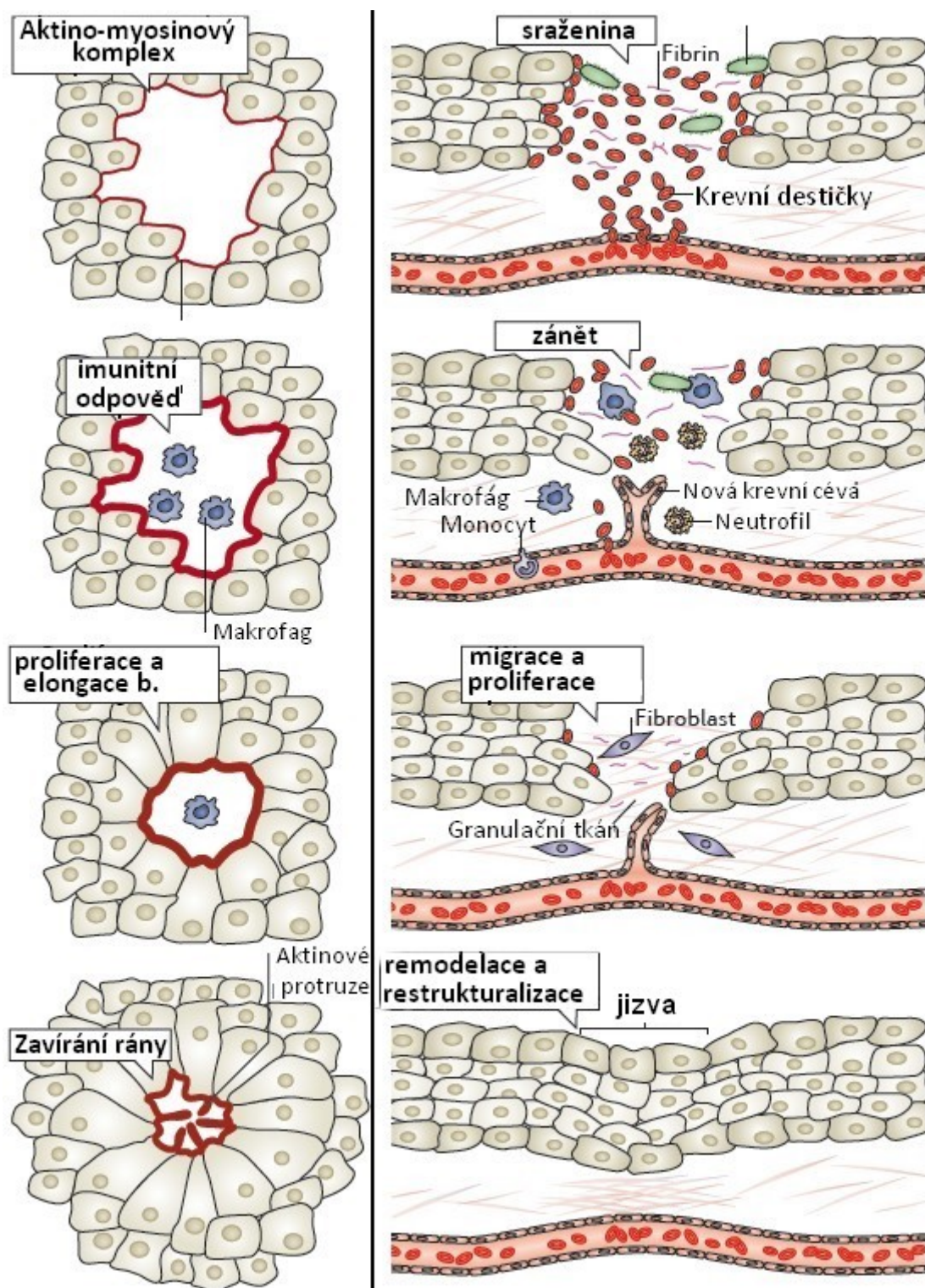
Ačkoli existuje mnoho vnitřních a vnějších rozdílů mezi vyvíjejícím se embryem a dospělým jedincem, které mohou ovlivnit opravu tkáně, důležitým charakteristickým rysem hojení embrya je minimální zánětlivá reakce (Bullard et al. 2003; Redd et al. 2004). Malé množství makrofágů a neutrofilů migruje do místa zranění (Hopkinson-Woolley et al. 1994), avšak agregace a degranulace destiček je potlačena (Olutoye et al. 1996). Zvýšená míra agregace odpovídá rozsahu tvorby jizev, což opět naznačuje, že degranulace a agregace destiček by mohla být jednou z příčin tvorby jizev (Larson et al. 2010).

Minimální zánětlivá odezva může proto hrát klíčovou roli v jedinečném mechanismu hojení embryí. Několik studií tuto hypotézu podporuje a výsledky naznačují, že vyvoláním zánětu při embryonálním hojení se urychluje tvorba jizev (Whitby a Ferguson 1991; Liechty et al. 2000). Srovnání hojení embryí a dospělců je znázorněno v **Obr. 2.** a **Tab. 3.**

Tab. 3: Rozdíly při hojení ran embryí a dospělců (Larson et al. 2010)

	Hojení ran dospělé	Hojení ran embrya
Obsah kolagenu	Dominantní kolagen I	Dominantní kolagen III
Kys. Hyaluronová	↓↓↓	↑↑↑
Adhezivní proteiny	↑ (souvisí s nízkou migrací fibroblastů)	↑↑↑ (stimulace buněčného pohybu)
Krevní destičky	↑ degranulace, agregace, PDGF	↓ degranulace, agregace
Buňky zánětu	↑↑↑ (mnoho)	↑ pouze několik
Interleukiny	↑↑↑ IL-6, IL-8	↑↑↑ IL-10 (protizánětlivý) ↓↓↓ IL-6, IL-8
TGF-β	↑↑↑ TGF-β1, TGF-β2	↓↓↓ TGF-β1, TGF-β2, TGF-β3
Genová exprese	↑ geny buněčné proliferace a růstu	↑↑↑ geny buněčné proliferace a růstu

IL-8 – Interleukin 8, TGF-β2 -transformační růstový faktor β2, TGF-β3-transformační růstový faktor



Obr. 2 Srovnání regeneračního (embryonálního) a reparativního procesu (u dospělců)

V levé části obrázku je znázorněno rychlé a efektivní embryonální hojení ran. To začíná formací aktino-myosinového komplexu, kontraktilní struktury, mající hlavní podíl na zavírání rány. Pokračuje minimální imunitní odpovědí a přítomností pouze několika makrofágů. Dochází k elongaci buněk a následné proliferaci. Nakonec s pomocí aktino-myosinových struktur a aktinových protruzí dochází ke kontrakcím a zavírání rány. Výsledkem je tkáň, která nemá žádné stopy po předchozím poškození.

V pravé části obrázku je naopak znázorněno zdlouhavé a komplikované hojení ran dospělých jedinců. Nejprve krevní destičky adheřují ke kolagenům a vytváří krevní sraženinu, aby se zastavilo krvácení. Sraženina a poraněná tkáň posléze uvolňují prozánětlivé cytokiny a vytváří se zánět, při kterém je uskutečněna koordinovaná a cílená destrukce tkáně. Zároveň jsou z prostředí eliminovány patogeny.

Začíná tvorba nových cév, které usnadňují migraci buněk imunitního systému a živin. Následuje migrace a proliferace fibroblastů a epitelových buněk do místa poranění, kde dochází k obnově ECM. Konečným procesem je remodelace. Tento proces vede k nahrazení prozatimní granulační tkáně. Účastní se ho MMP a postupně dochází k úplnému zhojení, které je ukončeno zformováním jizvy (upraveno podle Cordeiro et Jacinto 2013).

Embryonální hojení má jedinečné pochody v signalizaci, rozdílně uspořádaném ECM a na rozdíl od dospělých jedinců, vykazuje naprosto odlišnou imunitní odpověď na zranění. Díky tomu představuje jedinečné prostředí, jehož detailnější pochopení může vést k průlomům v regenerační medicíně a tkáňovém inženýrství.

1.1.2.1. Modelový organismus *Xenopus laevis*

Ačkoliv je cílem regenerační medicíny zlepšit hojení a regeneraci u člověka, výzkum na zvířecích modelech poskytuje důležité informace na molekulární a buněčné úrovni. Embryonální hojení ran se v případě obratlovců studovalo na kuřeti (Martin et Lewis 1992a), myši (McCluskey et Martin 1995), potkanu (Ihara et Motobayashi 1992) i žábě (Stanisstreet et al. 1980).

Mezi různými modelovými systémy, které byly využívány pro zkoumání mechanismů regenerace, je i obojživelník *Xenopus laevis*. Tato žába v embryonálních a larválních stádiích zaceluje epidermální rány bez tvorby jizev (Beck et al. 2009). Nicméně na rozdíl od mloků, kteří mají regenerační kapacitu po celý život, *Xenopus* ztrácí po metamorfóze schopnost plně regenerovat tkáň. Tato regenerační schopnost, závislá na stupni vývoje, poskytuje vhodný model pro zkoumání progresivní ztráty regeneračních schopností prostřednictvím ontogeneze. Poskytuje také vynikající systém pro identifikaci mechanismů, které zajišťují regenerační kapacitu (Beck et al. 2009; Lin et al. 2013).

Mezi klíčové výhody tohoto systému patří vývoj *ex utero*, který umožňuje snadné pozorování a manipulaci s embryi ve všech vývojových stádiích. Další velkou výhodou je relativně nenáročný chov a sezónně neomezená možnost produkce velkého množství vajíček a embryí. *Xenopus* má také publikovaný genom (Session et al. 2016), umožňuje transgenní modifikace (Kroll et Amaya 1996) a jsou dostupné nástroje pro genomovou editaci (Suzuki et al. 2013).

Relativně velká a snadno kultivovatelná vajíčka byla použita ke studování hojení ran na úrovni jedné buňky, což je model sdílející mnoho společných rysů s komplikovanějšími mechanismy mnohobuněčné tkáně a orgánů (Sonnemann et Bement 2011).

Xenopus je tak všestranným a vhodným systémem pro výzkum embryonálního hojení ran. Jsou však zapotřebí další srovnávací studie, zaměřené na mechanismus hojení v různých stádiích, pro srovnání tohoto procesu u žab a savců. V budoucnosti by mohlo hlubší porozumění hojení a regenerace získané výzkumem na modelovém organismu *Xenopus*, vést ke spřesnění vývoje léčby a identifikaci vhodných kandidátních genů a molekul pro medicínu.

1.1.3. Molekulární regulace hojení

1.1.3.1. Regulace dospělého hojení

Kromě zahájení zánětlivé kaskády, způsobuje zranění také reaktivaci vývojových drah, které v mnoha ohledech připomínají vývoj tkání během embryogeneze. Vývojové dráhy jsou aktivovány zánětlivými faktory na začátku proliferační fáze a jsou rozhodující pro uzavření rány a remodelaci, ke kterým dochází v pozdějších fázích. Klíčové dráhy, aktivovány během hojení, jsou Hedgehog (HH), Wnt (wingless-INT), TGF- β , Notch (Arnold et al. 2015).

Dráha Hedgehog je klíčová a podílí se na mnoha aspektech embryonálního vývoje, včetně regulace embryonálních kmenových buněk, tkáňové modelace a angiogeneze (Ruiz i Altaba et al. 2002). Aktivace dráhy HH nastane, když se ligand (Sonic, Desert nebo Indian) naváže na povrchový receptor Patched (PTCH). Tato vazba uvolňuje inhibici transmembránového receptoru Smoothened (SMO), čímž nastartuje signalizační kaskádu. Ta má za následek jadernou translokaci transkripčních faktorů rodiny Gli. Faktory Gli cílí na geny kontrolující proliferaci, angiogenezi, diferenciaci, EMT (epiteliálně-mezenchymální tranzici) a přežívání buněk. V případě hojení tkání, aktivace signalizace HH podněcuje proliferaci a migraci epiteliálních buněk (Crosby et Waters 2010; Watkins et al. 2003). HH signalizace je aktivována v okolí rány a podporuje plasticitu epidermálních buněk během reepitelizace, což vede ke zvýšení počtu populace kmenových buněk (Le et al. 2008).

Dráha Wnt je důležitou součástí embryonálního vývoje, reguluje buněčnou diferenciaci a EMT. K signalizaci dochází po vazbě sekretovaných glykoproteinů Wnt na membránový protein Frizzled. Vazba stimuluje mediátor Dishevelled, který stabilizuje transkripční ko-aktivátor β -katenin. V opačném případě je β -katenin degradován. Při poškození tkáně jsou Wnt ligandy vysoce exprimovány během počátečních fází hojení a podporují migraci epiteliálních buněk (Okuse et al. 2005).

Super rodina TGF- β obsahuje velký počet strukturně příbuzných proteinů, zahrnuje i TGF- β cytokiny (TGF- β 1, TGF- β 2 a TGF- β 3) a „bone morphogenic“ proteiny (BMP). Rodina TGF-

β má mnoho fyziologických funkcí, jako je embryonální vývoj, imunitní odpověď či hojení ran. Během zranění je TGF- β vylučován mnoha buněčnými typy, včetně krevních destiček, makrofágů, endotelových buněk, keratinocytů a fibroblastů. Mohou být také uvolněny při degradaci ECM. Během hojení ran se TGF- β účastní i angiogeneze, infiltrace zánětlivých buněk, proliferace fibroblastů či kontrakce rány (Margadant et Sonnenberg 2010; Schultz et Wysocki 2009).

Signalizační dráha Notch reguluje diferenciaci, proliferaci a přežití buněk (Lewis 1998). Aktivace dráhy Notch nastane po vazbě jednoho ze čtyř transmembránových Notch receptorů (Notch1-4) s jedním z pěti ligandů proteinových rodin Delta nebo Jagged (Lindsell et al. 1995). Po vazbě ligandu na receptor dojde k sérii štěpení extracelulární Notch domény. Štěpení uvolňuje aktivní intracelulární doménu NICD (Notch intracellular domain), která se přesunuje do jádra, kde funguje jako transkripční aktivátor genů spojených s diferenciací a přežitím buněk (cyklin D1, c-Myc) (Borggreve et Oswald 2009). V rámci hojení je Notch dráha důležitá ve fázi zánětu, během proliferace a migrace endoteliálních buněk, keratinocytů a fibroblastů do místa poranění (Arnold et al. 2015). Zdá se, že role dráhy Notch během hojení může být i tkáňově závislá (Movahedan et al. 2012).

1.1.3.2. Regulace embryonálního hojení

Jak již bylo řečeno, hojení embryonálních ran poskytuje dokonalý příklad vysoce účinné obnovy integrity tkání a homeostázy. Liší se od hojení dospělých jedinců ve všech aspektech. Vyžaduje dvě funkčně odlišné aktinové struktury: kontraktilní aktino-myosinový komplex, přibližující buňky na opačných stranách poranění a aktinové výčnělky na okraji rány, které dokončí proces zavírání. Tyto dva procesy jsou uskutečnitelné převážně díky aktivaci Erk (extracelulárně regulovaná kináza) a PI3K (fosfatidylinositol-3-kináza) (Li et al. 2013).

Vápenaté ionty (Ca^{2+}) jsou primárním elementem při procesu hojení (Stanisstreet 1982). Buňky při okraji rány produkují ihned po poranění vysokou hladinu Ca^{2+} , které aktivují fosforylaci ERK. Dále Ca^{2+} podporují aktivaci rodiny Rho GTPáz (RhoA (Ras homolog gene family, member A), Rac1 (Ras-příbuzný C3 botulotoxin substrát 1) a Cdc42 (protein zapojený do regulace buněčného cyklu, homolog 42)), které jsou nezbytné pro vytvoření a kontrakci aktino-myosinového prstence na okraji rány (Clark et al. 2009; Burkel et al. 2012). Rho reguluje tvorbu stresových, kontraktilních vláken (Ridley et Hall 1992; Wood et al. 2002), Cdc42 podporuje formování filopodií, které dokončí uzavření rány (Wood et al. 2002; Nobes et Hall 1995) a Rac řídí akumulaci aktinu (Ridley et Hall 1992).

Erk/MAPK signalizace je první a nejrozsáhleji studovanou podskupinou MAPK (mitogenem aktivovaných proteinkináz) u modelu *Xenopus laevis*. Aktivace signalizace Erk/MAPK je univerzální reakce na zranění v různých systémech (Dieckgraefe et al. 1997; Christen et Slack 1998). Signální kaskádu aktivuje široká škála růstových faktorů a mitogenů. V případě embryí, je Erk fosforylována 15 minut po poranění a zůstává fosforylována jednu hodinu (Christen et Slack 1998). V signální dráze MAPK je mnoho proteinů kódováno onkogeny, a proto je tato signalizace kritická i co se týče rozvoje a výzkumu rakoviny (Seger et Krebs 1995).

PI3K signalizace je klíčovým regulátorem migrace buněk. Nejvyšší aktivity dosahuje v pozdějších fázích hojení (Li et al. 2013). Akumulace PI3K a PIP3 (fosfatidylinositol-(3,4,5)-trisfosfát) v buňkách první linie při okraji rány, poskytuje první směrovací signál intracelulárního gradientu (Funamoto et al. 2002). Gradient PIP3 zajišťuje jak tvorbu F-aktinu v přední části migrujících buněk, tak kontrakci aktino-myosinu v zadní části (Merlot 2003). Signalizace PI3K cílí i na malé GTPasy Rac, Cdc42 a Rho, jejichž aktivace výrazně podporuje migraci (Cain a Ridley 2009).

Při hojení embryonálních ran bylo popsáno několik signálních cest zmíněných výše, ty podporují reorganizaci cytoskeletu a kolektivní migraci buněk. Avšak jejich vzájemná regulace, aktivní geny či další dráhy, zahrnuté v tomto hojení, jsou stále otázkou. Mnoho informací nemáme ani o poslední fázi vnitřní remodelace, kdy se rána na povrchu zdá již zhojena, ale vnitřní přestavby stále běží. Bohužel v porozumění embryonálního hojení je stále mnoho otázek, a nevíme, co vede k dokonalé remodelaci bez náznaku předchozího poranění.

1.1.4. Matrix metaloproteinázy

Přestavba, degradace a migrace buněk v ECM je možná díky činnosti MMP. Rodina enzymů MMP jsou na Ca^{2+} závislé a Zn^{2+} obsahující endopeptidázy. U lidí jich nalezneme 24 a u *Xenopus laevis* jich bylo dodneška určeno 20 (Fu et al. 2009). Enzymy se podílejí na degradaci ECM (Giannandrea a Parks 2014), kontrolují správný proces buněčného dělení (Parks et al. 2004) a migraci buněk (Chen et Parks 2009). MMP mohou také regulovat signalizaci na úrovni buňka-buňka či buňka-matrix. Uvolňují či umlčují cytokiny i růstové faktory a modifikují receptory buněčného povrchu, čímž regulují procesy jako je zánět, reepitelizace, remodelace či apoptóza (Chen et Parks 2009; von Lint et Libert 2007).

Členové rodiny MMP sdílejí strukturní a sekvenční podobnost. Flexibilní pantová oblast je bohatá na aminokyselinu prolin a C-terminální doména, vázající hem, slouží k rozpoznávání

substrátů. Na základě organizace domény a preference substrátu, můžeme MMP rozdělit do několika skupin viz **Tab. 4**.

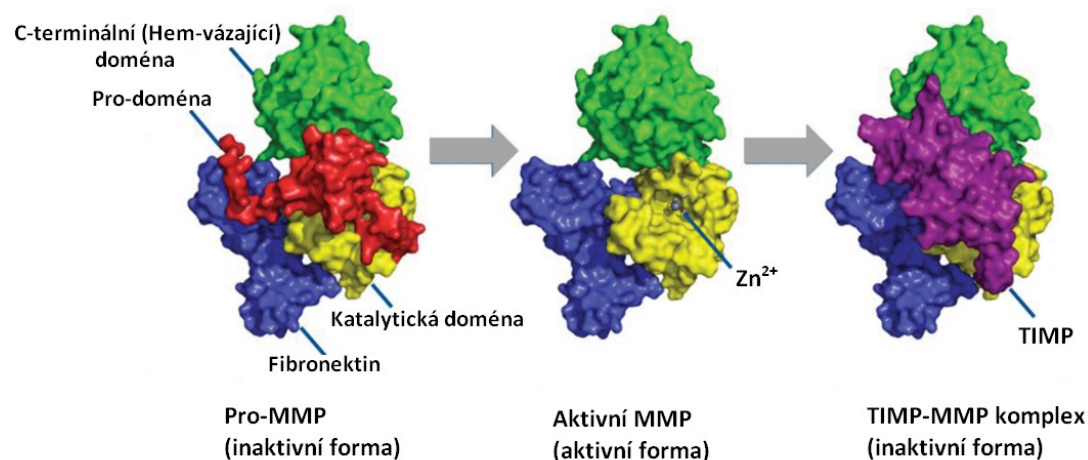
Transkripční aktivace MMP je uskutečněna pomocí cytokinů/růstových faktorů, které zahrnují interleukiny, interferony, EGF, KGF, FGF, VEGF, PDGF, hepatocytární růstový faktor (HGF), TNF- α a TGF- β . Do aktivace MMP jsou zahrnuty různé signální dráhy – MAPK, signalizace dependentní na růstových faktorech či cytokinech (NF- κ B (nukleární faktor kappa B), Smad), aktivace β -kateninu pomocí kadherinů či aktivace fokální adhezní kinázy (FAK) aktivací integrinu (Yan et Boyd 2007).

Tab. 4: Rozdělení MMP do skupin podle preference substrátu a organizace C-terminální domény (Martins et al. 2012; Kudaka et al. 2016)

Skupina	Členové	Substráty
Kolagenázy	MMP-1 MMP-8 MMP-13	Kolagen typu I, II, III, V, VII, VIII, X, gelatin, IL-1, MMP-2, MMP-9, fibronectin
Gelatinázy	MMP-2	gelatin, kolagen I, II, III, IV, V, VII, X, XI, fibronectin, laminin, elastin, proMMP-9, MMP-13, IL-1, TGF- β
	MMP-9	gelatin, kolagen III, IV, V, VII, X, XI, elastin, laminin, fibronectin, vitronectin, IL-1, TGF- β , plasminogen
Stromelysin	MMP-3 MMP-10 MMP-11	proteoglykany, fibronectin, laminin, elastin, gelatin, vitronectin, plasminogen, fibrinogen, fibrin, kolagen typu III, IV, V, MMP-1, MMP-2, MMP-8, MMP-9, MMP-13
Matrilysin	MMP-7 MMP-26	kolagen typ IV, glykoproteiny, gelatin
Membránové MMP (MT-MMP)	MMP-14	kolagen I, II, III, gelatin, fibronectin, laminin, proteoglykany, pro-MMP-2, pro-MMP-13
	MMP-15	pro-MMP2
	MMP-16	
	MMP-17	
	MMP-24	
	MMP-25	Gelatin
Ostatní MMP	MMP-12 MMP-19 MMP-21 MMP-23 MMP-27 MMP-28	amelogenin, agrekan, elastin, kolagen IV

Většina MMP je produkována jako latentní enzymy a aktivní forma vzniká odstraněním propeptidové domény různými mechanismy (**Obr. 3**) (McCawley et Matrisian 2001; Pei et Weiss 1995). MMP jsou inhibovány tkáňovými inhibitory TIMP (tkáňové inhibitory metaloproteináz), což je rodina, obsahující 4 inhibitory (TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 a TIMP-4). Jedná se o 20-39 kDa velké, sekretované proteiny, které působí jako přirozené endogenní inhibitory. Vykazují odlišnou tkáňovou expresi a způsoby regulace. Všechny MMP jsou

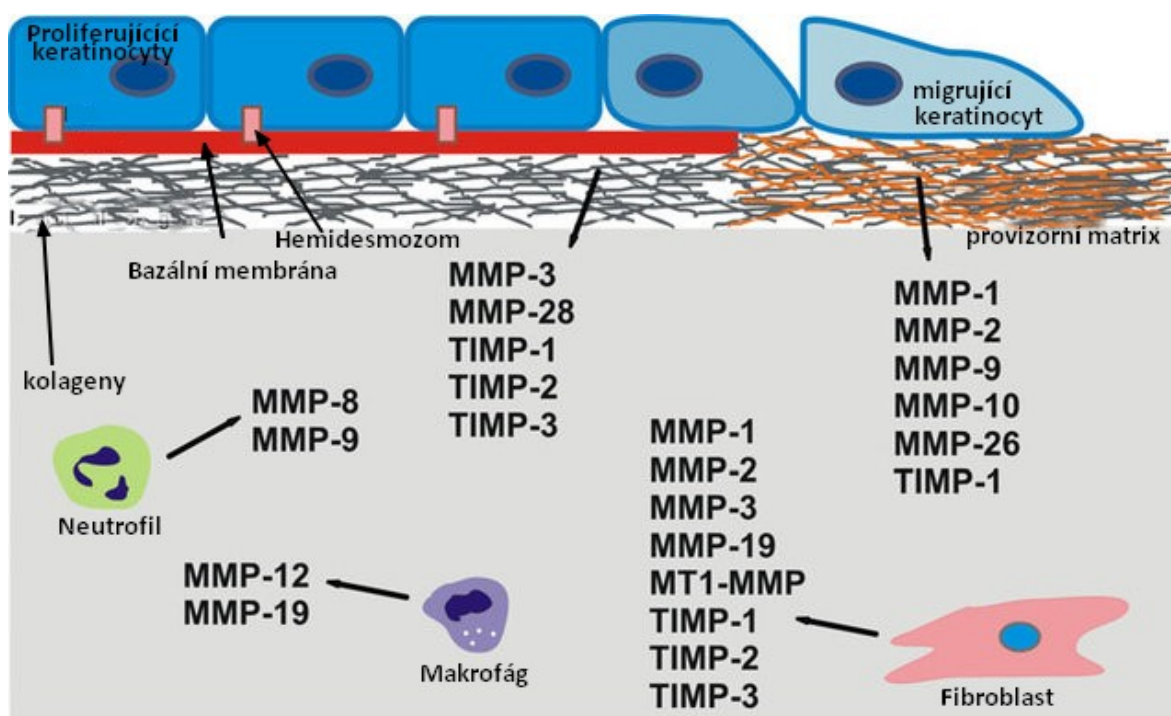
inhibovány v aktivní formě, ale gelatinázy (MMP-2 a MMP-9) mohou vytvářet komplexy s TIMP i v latentní formě (Brew et al. 2000; Baker 2002).



Obr. 3 Znázornění tří forem MMP

MMP existují ve třech formách: pro-MMP (neaktivní), aktivní MMP a TIMP-MMP komplex (neaktivní). MMP se nejprve vyskytují jako latentní pro-MMP s pro-doménou (zobrazenou červeně), blokující aktivní místo (zobrazeno žlutě). Odstranění prodomény a odhalení Zn^{2+} v katalytickém místě je nutné pro aktivaci MMP. Aktivní MMP jsou pak schopny štěpit substráty. Aktivita MMP je regulována interakcí s TIMP (znázorněno fialově), které inaktivují MMP (upraveno podle Nguyen et al. 2016).

Během hojení je aktivita těchto enzymů přesně řízena. Jsou produkovány ve všech fázích poranění, avšak na různých místech a rozličným spektrem buněk (keratinocyty, fibroblasty, endotelové buňky, buňky zánětu) (**Obr. 4**). Za normálních podmínek nejsou MMP ve tkáni exprimované anebo na velmi malé úrovni. Pokud nastane rekonstrukce tkáně, je aktivace MMP velmi rychlá a koordinovaná (Caley et al. 2015). Při obnově tkáně je zvýšená exprese genů *mmp2*, *mmp3*, *mmp9*, *mmp11*, *mmp12*, *mmp13* a *mmp14* (Sabino et al. 2015).



Obr.4 MMP a TIMP v prostředí rány

Keratinocyty mění svůj fenotyp po narušení hemidesmozomů, které je připevňují k bazální membráně. Dostávají se tak do kontaktu s provizorní matrix z fibronektinu a fibrinu (oranžově). Pod bazální membránou se nachází extracelulární matrix, složená převážně z kolagenu typu I (šedě). Rozdílná exprese MMP a jejich inhibitorů TIMP je rozhodující při hojení ran. Některé MMP jsou exprimovány migrujícími keratinocyty, zatímco jiné jsou exprimovány pouze proliferujícími keratinocyty. MMP exprimované zánětlivými buňkami (makrofágy, neutrofil) také přispívají k hojícímu procesu (upraveno podle Martins et al. 2012).

Bazální keratinocyty během procesu hojení narušují své hemidesmozomy a dochází k narušení kontaktu s BM. Tímto je umožněna migrace skrz matrix rány, kterou moduluje MMP, a hrají tak v tomto procesu zásadní roli (**Obr. 4**). Migrující keratinocyty pak mohou v závislosti na interakci s rozdílnými komponenty ECM aktivovat různé integriny, kolagenové receptory a fibronektinové (laminin vázající) receptory (Caley et al. 2015).

MMP a jejich inhibitory jsou schopny ovlivňovat mnoho molekul. Ztráta kontaktu s BM a nové interakce migrujících keratinocytů s provizorní matrix indukuje produkci MMP-1 (Saarialho-Kere et al. 1993). Důležitou roli v migraci keratinocytů zastává i MMP-9, která je exprimována při apikálním okraji migrujících buněk přiléhajících k ráně. Časná zánětlivá reakce, spjata s tvorbou fibrinové sraženiny, překrývající se s angiogenezí a následnou reepitelizací, je charakteristická zvýšením hladiny hlavně MMP-2 a MMP-9 (Caley et al. 2015). Při kontrakci a zavírání rány se uplatňuje zejména MMP-3 (Bullard et al. 1999). V souvislosti s degradací ECM, převážně kolagenu různého typu, jsou spojovány především MMP-3, MMP-7, MMP-10, MMP-11 a MMP-12 (Murphy et al. 1991). Enzym MMP-7 vykazuje vysokou afinitu k elastinu a entaktinu, bílkovinám, které spojují kolagen a laminin BM (Sires et al.

1993). V pozdní fázi remodelace je aktivní MMP-8, která je exprimována a vylučována převážně neutrofily a exprese vrcholí po čtyřech dnech (Nwomeh et al. 1999). Celé hojení je ukončeno vytvořením jizvy. Úloha MMP při utváření jizvy není zcela zřejmá a liší se u studovaných modelů, například u svalového poškození se ukazuje, že MMP-10 podporuje ukládání kolagenu a tím tvorbu jizvy (Bobadilla et al. 2014), ale u kožní rány naopak podporuje jejich rozpad (Rohani et Parks 2015).

Zásadní roli hrají i u chronických ran, kdy byla pozorována zvýšená exprese MMP. Rány se rozvinou, když při procesu hojení neproběhnou všechny fáze, ale hojení je zablokováno v patologickém stavu zánětu, spojeného se zhoršenou neovaskularizací, sníženou syntézou kolagenu, zvýšenou proteolytickou aktivitou a špatnou funkcí makrofágů (Ren et al. 2014). Chronické rány jsou charakterizovány zvýšenou hladinou a aktivitou kolagenáz (MMP-1 a MMP-8), gelatináz (MMP-2 a MMP-9) a abnormálně nízkými hladinami TIMP (Li et al. 2007; Menke et al. 2007).

Většina informací o MMP, jejich aktivitě a úloze při hojení, je prostudovaná u dospělých jedinců. Avšak úloha v embryonálním hojení není objasněna. Především jejich role během remodelace, kdy je rána nahrazena zcela identickou tkání. Na základě poznatků a našich dílčích výsledků víme, že v pozdní fázi remodelace (po 3-6 hodinách od poranění), tedy v době, kdy se zdá na pohled rána již zahojena, roste aktivita některých MMP.

1.1.5. Bazální membrána

Bazální membrána je 50-100 nm vrstva specializovaného proteinového komplexu ECM, identifikovatelná pomocí transmisní elektronové mikroskopie (TEM). Je podkladem všech monovrstev (epitel, endotel) a odděluje je od pojivové tkáně. Poskytuje rozhraní mezi dermis a epidermis, buňkám strukturální podporu a ovlivňuje a upravuje buněčné chování prostřednictvím signalizace (LeBleu et al. 2007). Hlavní komponenty BM jsou kolagen typu IV, laminin, nidogen a perlekan. Kolagen typu IV i laminin se shlukují do superstruktur a obě sítě jsou pro BM klíčové z hlediska stability (Poschl 2004; Miner 2004).

BM je na základě TEM rozdělena do tří morfologických vrstev. Přímě pod plazmatickou membránou bazálních keratinocytů je umístěná *lamina lucida*, ta obsahuje kotvící vlákna (tvořená převážně kolagenem typu XVII). Vlákna spojují adhezní komplexy keratinocytových hemidesmosomů s další vrstvou BM - *lamina densa*, která je tvořena polymery laminin/kolagen typu IV. BM je pak spojena s dermis vrstvou kotevních vláken (smyčkovité struktury kolagenu typu VII), které spojují laminin v *lamina densa* s vlákny kolagenu I a III v dermis. Třetí vrstva

je *lamina fibroreticularis*, přiléhá kotvícími vlákny tvořenými kolagenem IV a fibrilinem na *lamina densa* a je variabilní tloušťky. *Lamina fibroreticularis* také ukotvuje BM na ECM (Hashmi et Marinkovich 2011; Villone et al. 2008; Fisher et Rittié 2018). V embryonálních tkáních chybí (Merker 1994).

Důležitou roli při tvorbě BM hraje rovnováha mezi produkcí a degradací jednotlivých složek. Během tvorby jsou komponenty laminin a kolageny typu IV a VII, poskytovány keratinocyty a fibroblasty, a poté prostřednictvím specifických molekulárních interakcí shlukovány do supramolekulárních komplexů. Je pravděpodobné, že nerovnováha mezi syntézou MMP a TIMP indukuje nadměrnou proteolýzu komponentů BM, což vede k potlačení interakcí vedoucích k tvorbě BM (Amano et al. 2001).

K poškození epidermální BM dochází působením UV záření, což může přispět k celkovému stárnutí pokožky (Amano 2009), poškození např. glomerulární BM vede k onemocnění ledvin (Miner 2012). Oprava BM po poranění je tedy důležitá pro obnovu funkčních vlastností. Nicméně detaily týkající se opravy během hojení nejsou zcela objasněny. Stanley et al. (1981) zaznamenali přítomnost antigenu BM v ložisku rány během migrace nového epitelu, avšak nebyl přítomen laminin ani kolagen IV. Clark et al. (1982) pozorovali, že se laminin a kolagen IV objevují po dokončení reepitelizace rány.

Ramos-Lewis et al. (2018) jako první prokázali existenci jizev v BM po zahojení rány v embryu *Drosophily melanogaster*. Jizva BM je charakterizována zvýšeným ukládáním základních komponentů lamininu, kolagenu typu IV, perlekanu a nidogenu do místa zhojené rány. Tvorba jizev může vysvětlovat, proč opravená BM neobnovuje plně svou adhezivní funkci i několik měsíců po zahojení rány rohovky (Khodadoust et al. 1968).

BM i enzymy MMP jsou klíčové složky pro správné hojení. Přestavba ECM i BM pomocí MMP je konzervovaný proces při vývoji, růstu i hojení u široké škály organismů od hád'átka (*C. elegans*) až po savce (Xu et al. 2012; Rozario et DeSimone 2010). Současně je důležitost BM zmiňována i v souvislosti s rozvojem rakoviny, kdy jedním ze znaků („hallmarks of cancer“) maligního invazivního fenotypu, je proniknutí neoplastických buněk přes BM (Hotary et al. 2006; Lu et al. 2012).

2. Cíle

Cílem této diplomové práce bylo studium embryonálního hojení ran na molekulární i buněčné úrovni. Konkrétně se práce zaměřuje na bazální membránu (BM) a enzymy matrix metaloproteinázy (MMP), které degradují komponenty extracelulární matrix (ECM) i BM. Jako modelový organismus byla zvolena embrya *Xenopus laevis*.

Hlavní hypotézy vycházejí z pozorování, dílčích výsledků Laboratoře genové exprese a z předběžných výsledků RNA-Seq (RNA sekvenování), provedeného v minulosti:

1. Exprese některých *mmp* je nezbytná pro remodelaci tkáně po poranění, a je aktivovaná v pozdní fázi hojení (po uzavření rány).
2. Správná struktura BM je nezbytná pro úspěšné hojení.
3. Buňky na okraji poranění se chovají rozdílně v závislosti na typu a tvaru zranění

Jako hlavní cíle byly vytyčeny:

1. Otestovat ve funkčních experimentech geny pro MMP (*mmp7*, *mmp8*, *mmp9*, *mmp11*), vycházející z předchozí analýzy RNA-Seq.
2. Studium BM při hojení.
3. Prokázat, zda má typ poranění vliv na morfologii buněk v průběhu hojení.

3. Materiál a metody

3.1. Embrya

K experimentům byl využíván modelový organismus *Xenopus laevis*. Ve všech experimentech je základní médium pro embrya 0,1x MBS („*Modified Barths Saline*“: 8,8 mM NaCl; 0,1 mM KCl; 0,5 mM HEPES pH 7,8; 0,07 mM CaCl₂; 0,1 mM MgSO₄; 0,25 mM NaHCO₃) + gentamicin (20 µg/ml, Sigma-Aldrich). Chov pokusných zvířat je zaveden v rámci Laboratoře genové exprese, která je součástí Biotechnologického ústavu AV ČR, a je v souladu s právními předpisy o využití a chovu laboratorních zvířat.

Pro získání vajíček byly samice injekčně stimulovány 400 IU lidským choriogonadotropinem (Sigma-Aldrich) a nechány přes noc. Druhý den ráno byla vajíčka pomocí masáže získána ze samic, přenesena do HSS („*High Salt Solution*“: 1x MBS, 20 mM NaCl) a oplodněna *in vitro* spermiemi získanými homogenizací samčích varlat. Pomocí cysteinu (L-cystein hydrochlorid monohydrát (HSCH₂CH(NH₂)COOH · HCl · H₂O, Sigma-Aldrich) (2% cystein; pH 7,8 upraveno 5 M NaOH) byla vajíčka zbavena ochranných obalů a kultivována při 15 °C v 0,1x MBS s gentamicinem (do stádia 22-28 podle systému Nieuwkoop et Faber (1994)).

3.2. Poranění

Odblaněná embrya ve stádiu 22-28 byla poraněna pinzetou v laterální oblasti horizontálně, vertikálně či jednoduchým štípnutím. Podle typu experimentu byla embrya ponechána se hojit po konkrétní dobu při pokojové teplotě. V požadovaném čase od zranění (0, 15, 30, 60, 90, 180, 360 min) byla embrya zafixována v 4% paraformaldehydu (PFA) a využita pro další experimenty.

3.3. Chemická inhibice bazální membrány

Na základě optimalizačních experimentů byl vybrán inhibitor D609 (Calbiochem), který vykazoval největší fenotyp při hojení (Haralabopoulos et al. 1994; Maragoudakis et al. 1993). Byl rozpuštěn v DMSO (dimethylsulfoxid) na zásobní koncentraci 100 mM a uskladněn v -20 °C. Jako negativní kontrola hojení byl využíván inhibitor NO-syntázy TRIM (1-2-Trifluoromethylfenyl imidazol, Sigma-Aldrich).

3.3.1. Inhibice hojení

Chemikálie D609 byla přidána do média v 6 rozdílných koncentracích: 10; 5; 2; 1; 0,5; 0,25 $\mu\text{l/ml}$ média. Optimální koncentrace využívána pro inhibici hojení byla 0,02 mM (2 $\mu\text{l/ml}$ 0,1x MBS).

Embrya ve stadiu 22 byla manuálně odblaněna pomocí pinzety a kultivována 1 hodinu v médiu s inhibitorem D609 (2 $\mu\text{l/ml}$ 0,1x MBS). Následně bylo pinzetou provedeno požadované poranění a embrya byla ponechána v médiu s inhibitorem se hojit. Embrya byla poté buď celá zafixována v 4% PFA a použita pro imunohistochemické analýzy a *in situ* hybridizaci či poraněná část byla vyříznuta a uskladněna v $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ pro RT-qPCR.

3.3.2. Inhibice vývoje bazální membrány

Embrya ve stádiu 10 byla umístěna do média s inhibitorem D609 (0,1; 0,2; 0,5 $\mu\text{l/ml}$ 0,1x MBS) a při pokojové teplotě se vyvíjela 2 dny. Pro další experimenty byla zafixována v 4% PFA a poté imunohistochemicky analyzována.

3.4. Imunohistochemie

Poraněná embrya byla přes noc fixována v 4% PFA. Na druhý den byla promyta v PBT (0,1% Tween 20 (Sigma-Aldrich) v PBS (solný roztok fosfátového pufru, Sigma-Aldrich) (3x15 min) a připravena pro jednotlivé imunohistochemické analýzy.

3.4.1. Aktin

F-aktin byl vizualizován pomocí značeného Phalloidinu (Alexa fluor 488) v koncentraci 1:1000 vzhledem k barvicímu médiu (PBT; 0,1 % Triton X (Sigma-Aldrich); 0,1 % BSA (Hovězí sérový albumin, Thermo Scientific); 1 % koží sérum (Sigma-Aldrich). Vzorky byly nechány inkubovat se při $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ přes noc. Na druhý den byly 3x promyty v PBT (15 min), dobarveny jádra pomocí DAPI (Sigma-Aldrich) v barvicím médiu (1:1000, 10 min, pokojová teplota). Po inkubaci byly vzorky promyty roztokem PBT (3x10 min, pokojová teplota).

Po imunohistochemickém barvení byly vzorky namontovány na podložní skla, zality Aquapoly/mount (Polysciences) a přikryty krycím sklíčkem. Embrya byla nafocena konfokálním mikroskopem (Carl Zeiss LSM 880 NLO) ve spolupráci s Centrem zobrazovacích metod BIOCEV. Analýza obrázků byla provedena pomocí ZEN lite softwaru (2.1) a ImageJ (NIH, verze 1,42q).

3.4.2. Laminin

Po fixaci v 4% PFA přes noc a promytí v PBT byla embrya umístěna do 100% methanolu a nechána v -20 °C přes noc. Na druhý den byla embrya promyta roztokem PBT (5x15 min) a umístěna do rozpuštěné, vlažné 4% agarosy (Sigma-Aldrich). Po zatuhnutí byly vzorky nařezány na 150 µm řezy na přístroji Lecia Vibratom (VT1000 S). Jednotlivé vzorky byly 3 hodiny inkubovány v barvicím médiu. Následovala inkubace s primární protilátkou (polyklonální laminin, Sigma-Aldrich, ředění vůči barvicímu mediu 1:150) ve 4 °C přes noc. Na druhý den byly vzorky promyty roztokem PBT (3x10 min), přeneseny do barvicího media se sekundární protilátkou (1:500, Alexa 488 goat anti-rabbit, Life Technologies) a inkubovány ve 4 °C přes noc. Na druhý den byly vzorky promyty roztokem PBT (3x15 min). Nakonec proběhlo barvení DAPI (1:1000 barvicí médium, 10 min, pokojová teplota). Po inkubaci byly vzorky promyty roztokem PBT (3x10 min, pokojová teplota) a umístěny na podložní sklíčko (viz 3.4.1).

3.4.3. Kolagen

Poraněná, zafixovaná embrya v 4% PFA byla promyta v PBT (3x15 min). Následně byla dehydratována pomocí ethanolové řady (25 %, 50 %, 70 %). V každém kroku byla inkubována hodinu. Vzorky byly převezeny na Ústav molekulární genetiky, kde byly v Histologické laboratoři na přístroji Leica ASP200S vytvořeny parafinové bloky. Vzorky byly následně nařezány na 10 µm řezy na rotačním mikrotomu Leica RM2255 a umístěny na podložní sklíčka. Takto připravené řezy byly odparafinovány xylenem a sestupnou ethanolovou řadou (xylén 3x5 min, 100% EtOH 5 min, 90% EtOH 5 min, 70% EtOH 5 min, destilovaná voda). Následovalo barvení (Massonův trichrom, Sigma-Aldrich). Připravené řezy byly nejprve barveny 5 minut fuchsinem, opláchnuty v dH₂O a 5 minut inkubovány v pracovním roztoku kyseliny fosfowolframové/fosfomolybdenové (kyselina fosfowolframová:kyselina fosfomolybdenová:voda ; 1:1:2). Poté byly na 5 minut umístěny do anilinové modři a následně na 2 minuty do 1% kyseliny octové. Řezy byly opatrně promyty dH₂O. Následovala dehydratace rychlým oplachem v ethanolové řadě (80 %, 90 %, 96 %) a ponoření do 100% ethanolu po dobu 5 minut. Nakonec byly vzorky vyčištěny xylenem (2x3 min), zality Depexem (Sigma-Aldrich) a přikryty krycím sklíčkem. Takto připravené řezy byly vyfoceny na makroskopu (Carl Zeiss AxioZoom.V16) a analyzovány ZEN lite softwarem (2.1) a Photofiltre 7.1.

3.5. Časová analýza genové exprese

3.5.1. Sběr tkáně

Pro sběr tkáně byly připraveny 2 ml zkumavky se sterilní kovovou kuličku, určenou pro homogenizaci (Stainless Steel Beads, Qiagen). Zkumavky byly řádně popsány a uloženy do suchého ledu. Embrya ve stadiu 22 byla poraněna v médiu 0,1x MBS s gentamicinem (kontrolní vzorky) a v médiu s inhibitorem D609 (2 µl/ml 0,1x MBS s gentamicinem). Vzorky se ve stejných médiích nechaly hojit a v časech 0, 30, 60, 90, 180, 360 min byla poraněná část vyříznuta, umístěna do 2 ml zkumavky a ihned zmrazena na suchém ledě. Pro každou podmínku byly vytvořeny biologické triplikáty. Jeden biologický replikát obsahoval poraněnou část ze tří embryí. Vzorky byly uskladněny v -80 °C.

3.5.2. Izolace RNA fenol-chloroformovou extrakcí

Do zkumavek s odebranou tkání byl přidán 1 ml vychlazeného komerčního TRI Reagent (Sigma-Aldrich), a na přístroji TissueLyser LT (Qiagen) byla tkáň homogenizována (5 min 50 Hz). Vzorky byly ponechány 15 min při pokojové teplotě a poté stočeny na stolní centrifuze GmCLab (Gilson). Ke vzorkům bylo přidáno 200 µl chloroformu a následně byly umístěny na 30 sekund do homogenizátoru. Poté byly ponechány 5 minut při pokojové teplotě (oddělování fází), zvortexovány a zanechány při pokojové teplotě dalších 10 minut. Následně byly vzorky umístěny do vychlazené centrifugy (15 min, 12000 g, 2 °C). Vzorky byly opatrně přeneseny do laminárního boxu a vodná fáze byla odebrána do zkumavek s 700 µl isopropanolu. Vzorky byly zvortexovány a ponechány při -20 °C 30 minut. Poté byly přeneseny do centrifugy a stočeny (30 min, 2 °C, 16100 g). Supernatant byl vylit a do zkumavek byl přidán 1 ml 80% ethanolu. Vše bylo zvortexováno a proběhla centrifugace (30 min, 2 °C, 16100 g). Obsah zkumavek byl slit a následovala centrifugace (2 min, 2 °C, 16100 g). Zbytky ethanolu byly opatrně odsáty a otevřené zkumavky byly umístěny do termostatu (15 min, 40 °C). Pelet byl rozpuštěn v 20 µl 1xTE pufru (Tris (tris-(hydroxymethyl)-aminomethan)/EDTA (ethylendiamintetraoctová kyselina), pH = 8, Invitrogen). Následoval krok odstranění DNA (deoxyribonukleová kyselina) kontaminace pomocí DNase I kitu (Sigma-Aldrich), 30 min při pokojové teplotě. Objem reakce byl 40 µl (28 µl TE pufru, 8 µl reakčního pufru, 4 µl DNase I). Následně byla provedena RNA (ribonukleová kyselina) precipitace ve 4 M chloridu litném (přidáním 40 µl 8 M LiCl Sigma-Aldrich). Vzorky byly zvortexovány, stočeny na stolní centrifuze a uskladněny do -20 °C přes noc. Druhý den byla provedena centrifugace (30 min, 2 °C, 16100 g). Supernatant byl jemně

odsán a vzorky byly promyty v 1 ml 80% ethanolu. Vše bylo zvoretoxováno a stočeno (30 min, 2 °C, 16100 g) a byl zopakován krok s 80% ethanolem. Supernatant byl vylit a vzorky byly centrifugovány (2 min, 2 °C, 16100 g). Ethanol byl jemně odsát a vzorky byly umístěny do termostatu (15 min, 65 °C) pro dokonalé odpaření posledních zbytků ethanolu. Na závěr byly vzorky rozpuštěny v 20 µl TE pufru, při teplotě 65 °C za občasného vortexování a následně umístěny na led. Nakonec byla změřena koncentrace RNA na spektrofotometru (Nanodrop 2000). Vyizolovaná RNA byla uskladněna v -80 °C.

3.5.3. Reverzní transkripce

Pro provedení reverzní transkripce byly všechny RNA vzorky naředěny na stejnou koncentraci (100 ng kontrolní vzorky, 15 ng inhibované vzorky, ředění 100x v TE). Pro kontrolu inhibice během reverzní transkripce (RT) byla použita univerzální kontrola RNA spike I (transkript známé sekvence a množství, nevyskytující se v žádném žijícím organismu, TATAA Biocenter). Pro kontrolu kontaminace genomické DNA při následné qPCR (kvantitativní polymerázová řetězová reakce), byl pipetován pouze vzorek RNA s vodou, bez reakční směsi. Reverzní transkripce byla provedena v objemu 10 µl viz **Tab. 5**:

Tab. 5: Reakční směs pro reverzní transkripci

Chemikálie	Objem [µl]
TATAA 5x GrandScript cDNA SuperMix (TATAA Biocenter)	2
RNA spike (TATAA Biocenter)	0,5
RNA	7,5

Syntéza DNA byla provedena za podmínek, uvedených v **Tab. 6**:

Tab. 6: Podmínky reakce přepisu RNA do cDNA:

Teplota	Doba trvání
25 °C	5 min
42 °C	30 min
85 °C	5 min

3.5.4. Kvantitativní PCR v reálném čase (qPCR)

Nejprve byly navrženy primery na konkrétní *mmp* v rozhraní intron/exon pomocí softwaru primer-BLAST (viz **Příloha 1**). Byly taky použity již navrhnuté funkční primery pro gen *mrpl1* (gen pro 39S ribosomální protein L1) pro kontrolu RNA. Ověření primerů proběhlo pomocí

gelové elektroforézy (2% agarosový gel (agarosa (Carl Roth) rozpuštěna v 0,5 TAE (Tris-acetát-EDTA) pufru, 1 µl/10 ml ethidium bromidu (Invitrogen)). Vzorky (7 µl) byly naneseny ve 2 µl nanášecího pufru (DNA Gel Loading Dye (6X), Thermo Fisher Scientific) Jako marker molekulové hmotnosti bylo použito 5 µl 1 kb plus DNA ladder (Thermo Fisher Scientific).

Finální mix primerů, využívaný při reakci, obsahoval Forward i Reverse, oba v koncentraci 10 µM. Pro všechny podmínky byl analyzován biologický triplikát. Součástí analýzy byla negativní kontrola (reakce bez cDNA), kontrola kontaminace genomickou DNA (RNA s vodou místo mixu při RT) a kontrola inhibice reverzní transkripce (spike). Reakce probíhala v objemu 7 µl viz **Tab.7**:

Tab. 7: Reakční směs využívaná pro qPCR analýzu

Reagencie	Objem [µl]
H ₂ O (NFW (Nuclease free water, ThermoFisher)	1,22
Specifické primery	0,28
2x TATAA SYBR® GrandMaster® Mix (TATAA Biocenter)	3,5
cDNA	2
Celkem	7

Následná qPCR reakce probíhala na dvou termo cyklérech - C1000™ Thermal Cycler CFX384™ Real-time system nebo CFX96™ Real-time system (Bio-Rad). Časové a teplotní podmínky jsou zobrazeny v **Tab. 8**:

Tab. 8: Časové a teplotní podmínky PCR reakce

Krok PCR	Teplota	Čas	Počet cyklů
Počáteční denaturace	95 °C	1:00	1
Denaturace	95 °C	0:03	50
Nasednutí primerů	60 °C	0:30	
Prodlužování	72 °C	0:10	
Křivka tání	65–95 °C 0,5 °C inkrement	0:05	1

Data genové exprese byla analyzována pomocí aplikace MS Excel. Hodnoty C_q byly za předpokladu 100% účinnosti PCR převedeny na relativní množství a dále analyzovány.

Relativní exprese v jednotlivých časových podmínkách byla vyjádřena jako poměr exprese v daném čase vůči času 0. Hodnoty byly normalizovány na množství celkové RNA:

$$RQ = 2^{\overline{C_{q0}} - C_q}$$

RQ	...	Relativní kvantita
C_{q0}	...	Průměrná hodnota cyklu kvantifikace času 0
C_q	...	Cyklus kvantifikace konkrétního času (30, 60, 90, 180, 360 minut od poranění)

3.6. Prostorová analýza genové exprese

3.6.1. Příprava RNA próby a memGFP

Bylo použito 1 µg plazmidu se zaligovanou sekvencí *mmp7* (Dharmacon), *mmp9* (EXRC) a plazmidu pCS2+ se sekvencí memGFP (membránový zelený fluorescenční protein).

Linearizace

Nejprve bylo nutné linearizovat plazmidy se zaligovanou sekvencí memGFP, *mmp7* a *mmp9*, které byly v minulosti připraveny v Laboratoři genové exprese. Pomocí restričních enzymů (NEB) byly plazmidy linearizované podle pokynů výrobce (viz **Tab. 9 a 10**).

Tab. 9: Reakce pro linearizaci plazmidu s memGFP

Chemikálie	Množství
Plazmid	1 µg
Restriční pufr 3.1	2 µl
Restriční enzym NotI (NEB)	2 µl
Voda (NFW)	do 10 µl

Tab. 10: Reakce pro linearizaci plazmidu s *mmp7* a *mmp9*

Chemikálie - <i>mmp7</i>	Množství
Plazmid	1 µg
Restriční pufr 1.1	2 µl
Restriční enzym KpnI (NEB)	2 µl
BSA	2 µl
Voda (NFW)	do 10 µl
Chemikálie – <i>mmp9</i>	
Plazmid	1 µg
Restriční pufr 3.1	2 µl
Restriční enzym SalI (NEB)	2 µl
BSA	2 µl
Voda (NFW)	do 10 µl

Restrikce proběhla při 37 °C přes noc a na druhý den byla úspěšnost zkontrolována pomocí gelové elektroforézy (1 µl směsi bylo nanесeno na 2% agarosový gel připravený s 0,5x TAE pufrem). V případě úspěšné restrikce byly plazmidy přečištěny pomocí GenElute™ PCR Clean-up kit (Sigma-Aldrich) podle pokynů od výrobce. Nakonec byla změřena koncentrace na přístroji NanoDrop-1000 (ThermoFisher).

Transkripce

- memGFP

Pomocí komerčního kitu (mMESSAGE mMACHINE™ SP6 Transcription Kit, Invitrogen™) bylo 1 µg linearizované DNA přepsáno do mRNA (mediátorová RNA). Reakční směs byla inkubována při 37 °C 3 hodiny. Následně byl v poměru 1:1 přidán roztok 8 M LiCl pro precipitaci mRNA (inkubace v -20 °C) přes noc.

- *mmp7* a *mmp9*

Přepis linearizované DNA do mRNA proběhlo v objemu 30 µl viz **Tab. 11**:

Tab. 11: Reakce pro transkripci *mmp7* a *mmp9*

Chemikálie	Množství
DNA templát	1 µg
Transkripční pufr	6 µl
DIG nukleotidy (Roche)	3 µl
Polymeráza T7 (Agilent)	3 µl
RNaseOUT (Invitrogen)	1 µl
Voda (NFW)	Do 30 µl

Následně byl v poměru 1:1 přidán roztok 8 M LiCl pro precipitaci mRNA (inkubace v -20 °C) přes noc.

Přečištění

Druhý den byly vzorky centrifugovány (30 min, 2 °C, 16100 g). Byl odebrán supernatant a přidán 1 ml 70% ethanolu. Ethanol byl slit a proběhla centrifugace (2 min, 2 °C, 16100 g), zbytky ethanolu byly odpařeny v 65 °C a vzorky byly rozpuštěny v 20 µl dH₂O při 65 °C za občasného vortexování. Nakonec byly vzorky umístěny na led a byla změřena RNA koncentrace na přístroji NanoDrop-2000 (ThermoFisher).

Nakonec byl 1 µg přepsané mRNA memGFP, *mmp7* a *mmp9* zkontrolováno pomocí denaturující gelové elektroforézy (0,5 g agarózy; 5 ml 10x MOPS pufru (3-(N-morfolino)propansulfonová kyselina); 43,5 ml dH₂O; 2,55 ml 37 % formaldehydu). Před

nanesením vzorku na gel proběhla denaturace RNA při 65 °C v 1x MOPS a následně byl vzorek nanášen v RNA nanášejícím pufru (1:1 RNA loading buffer, ThermoFisher). Současně bylo nanášeno 4 µl standardu molekulové hmotnosti (RiboRuler High Range RNA Ladder, ThermoFisher).

Takto připravené a ověřené mRNA mohlo být injikováno (memGFP) či použito pro *in situ* hybridizaci.

3.6.2 Fixace

Odblaněná, poraněná embrya (kontrolní i inhibovaná) byla zafixovaná v 4% PFA a posléze promyta v PBT roztoku (3x15 minut). Takto připravené vzorky byly podrobeny dehydrataci pomocí vzestupné methanolové řady (z 25% do 50%, 75%, 100%; 10 min na podmínku). Vzorky v 100% methanolu byly uskladněny v -20 °C (ne víc jak 1 měsíc).

3.6.3 *In situ* hybridizace

Celý protokol je rozdělen do 4 dnů. Nejprve byla embrya rehydratována sestupnou methanolovou řadou (ze 100% do 75%, 50%, 25%; 10 min v každé podmínce). Poté byly vzorky přesunuty do destičky a promyty v PBT (3x15 min). Následoval oplach v 0,1 M triethanolaminu (2x5 min) a 2x5 min v 4 ml 0,1 M triethanolaminu s 12,5 µl acetanhydridu. Embrya byla nakonec promyta v PBT (3x15 min) a inkubována v bělicím roztoku (1 ml 30% H₂O₂ (peroxid vodíku), 1 ml formamidu, 18 ml 2x SSC (solný roztok citrátu sodného, připraven zředěním 20x SSC v dH₂O, Sigma-Aldrich)) do bíla (přibližně 2 hodiny). Vybělená embrya byla promyta v 2x SSC (1x15 min), poté v PBT (2x15 min) a přesunuty do 2 ml zkumek s hybridizačním pufrem (50% formamid, 5x SSC, 1mg/ml Torula RNA, 100µg/ml heparin, 1x Denhardův roztok (100x Denhardův roztok: 2% BSA, 2% polyvinyl pyrrolidon (Sigma-Aldrich), 2% ficoll (GE healthcare), 0.1% Tween 20, 0.1% CHAPS (C₃₂H₅₈N₂O₇S · xH₂O, Sigma-Aldrich), 10mM EDTA (Sigma-Aldrich)). Vzorky byly jemně míchány a ponechány se inkubovat v 60 °C přes noc.

Následující den byl vyměněn hybridizační pufr a posléze byla k zahřátému hybridizačnímu pufru přidána sonda (0,5 µg/1 embryo). Takto ošetřená embrya byla ponechána inkubovat se při 60 °C přes noc.

Další den byla embrya přenesena do destičky a promyta zahřátým 2x SSC (4x30 min, 60 °C), zahřátým 0,2x SSC (4x30 min, 60 °C) a 0,2x SSC pokojové teploty (1x15 min, pokojová teplota). Následovalo promytí v MAB (Maleic Acid Buffer: 100 mM kys. maleinová;

150 mM NaCl; pH 7,5) 3x15 min v pokojové teplotě. Promytá embrya byla ponechána se inkubovat v blokovacím médiu 3 h (10% Boehringer Mannheim Blocking reagent : telecí sérum : MAB, 1:1:8) a potom byla přenesena do připraveného roztoku s protilátkou (0,63 µl anti-DIG-AP, Fab fragment (Roche); 1 ml blokovacího média) ponechána přes noc při 4 °C.

Embrya byla promyta v MAB (6x30 min, pokojová teplota), v AP pufru (100 mM Tris pH 9,5; 50 mM MgCl₂; 100 mM NaCl; 0,1 % Tween-20) (2x30 min) a nechány inkubovat ve tmě v barvicím médiu (10 ml AP pufr; 36 µl NBT (nitro blue tetrazolium, Roche); 28 µl BCIP (5-bromo-4chloro-3-indolyl phosphate, Roche) do obarvení embryí (asi 3 h). Obarvená embrya byla promyta v AP pufru (3x10 min) a následně inkubována ve 100% methanolu pro snížení pozadí (2x3 min). Embrya byla poté rehydratována pomocí sestupné methanolové řady (75%, 50%, 25%) a konečným krokem byla inkubace v PBT (2 min v každé podmínce). Nakonec byla embrya fixována ve 4% PFA, promyta v PBT (3x10 min) a vyfocena na makroskopu (Nikon SMZ 1500).

3.7. Chování buněk v okolí rány

Pro vizualizaci buněk při poranění byl použit zelený fluorescenční protein GFP (Green fluorescent protein), který se díky své speciální struktuře lokalizuje do membrány. Příprava memGFP je popsána v kapitole 5.1 příprava RNA próby a memGFP.

Pomocí přístroje IM 300 Microinjektor (Narishige) bylo injikováno 1 ng připraveného memGFP do právě oplodněných vajíček. Embrya byla ponechána se při 15 °C vyvíjet v 0,1x MBS s gentamicinem. Na druhý den byla na mikroskopu Leica MZFLIII zkontrolována úspěšnost injikace na základě zelené fluorescence embryí.

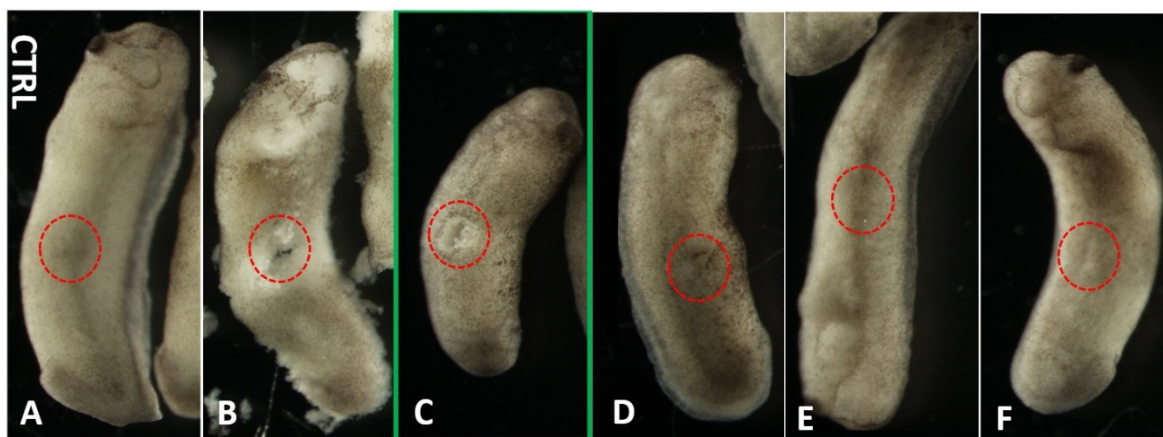
Pozitivní embrya byla umístěna do Petriho misky s roztokem 0,1x MBS a vytvořenou prohlubní v agaróze. Embryo bylo zraněno v laterální oblasti pinzetou a každých 5 minut byl proces hojení dokumentován na přístroji Carl Zeiss AxioZoom.V16.

4. Výsledky

4.1. Optimalizace koncentrace inhibitoru D609

V experimentech byl využíván inhibitor syntézy kolagenu typu IV BM D609. Nejprve bylo nutné zjistit správnou koncentraci inhibitoru, tj. aby embrya přežívala, avšak aby byl zastaven proces hojení.

Embrya byla poraněna a ponechána se hojit v médiích s inhibitorem 180 min. Následně byla vyfocena na makroskopu (**Obr. 5**). V médiu s nejvyšší koncentrací inhibitoru 1mM (10 μ l/ml média) se embrya rozpadala (dokumentace chybí). Jako nejlepší se jevila koncentrace 0,2 mM 2 μ l/ml média, jelikož byl proces hojení zastaven (**5B** v zeleném rámečku). Poranění jednotlivých embryí je zaznamenáno červeně. Koncentrace 0,2 mM (2 μ l/ml média) byla vybrána pro všechny následující experimenty. Embrya s inhibitorem byla srovnávána s embryi hojícími se v čistém médiu 0,1x MBS+gentamicin.

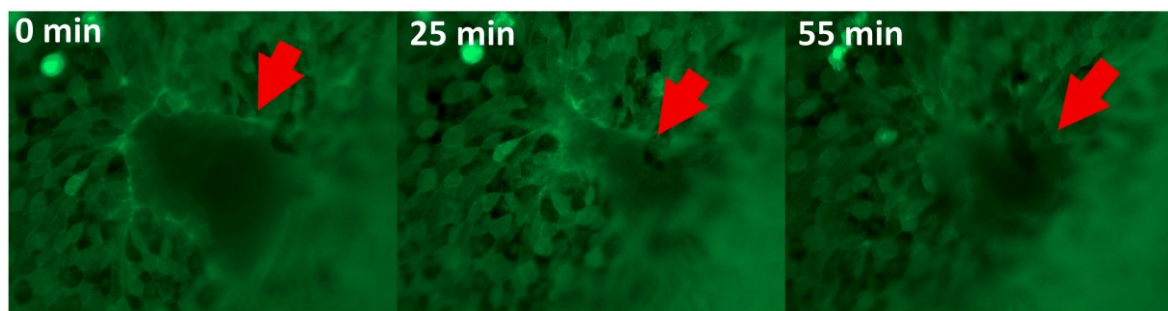


Obr. 5 Srovnání vlivu koncentrací inhibitoru D609 na zraněná embrya

Inhibitor D609 byl nejprve rozpuštěn v DMSO na zásobní koncentraci 100 mM. Embrya byla poraněna na laterální části a ponechána se hojit 3 h v médiu 0,1x MBS+gentamicin (A) či v médiu s inhibitorem D609 v koncentracích: 0,5 mM (B), 0,2 mM (C), 0,1 mM (D), 0,05 mM (E), 0,025 mM (F) 0,0125 mM. Následně byla vyfocena na makroskopu. Pro další experimenty byla vybrána koncentrace 0,2 mM (2 μ l/ml média 0,1x MBS+gentamicin) (C). Jednotlivá poranění jsou zaznamenána červeně.

4.2. Uzavírání rany

Proces hojení byl dokumentován v reálném čase každých 5 min na makroskopu (**Obr. 6**). Vizualizace jednotlivých buněk byla možná po injikaci GFP do embryí (viz 3.7). Následně bylo z jednotlivých snímků vytvořeno video pomocí programu Windows Movie Maker (**Příloha 3 - video**). Bylo injikováno více než 20 embryí a pokus záznamu byl opakován 3x.

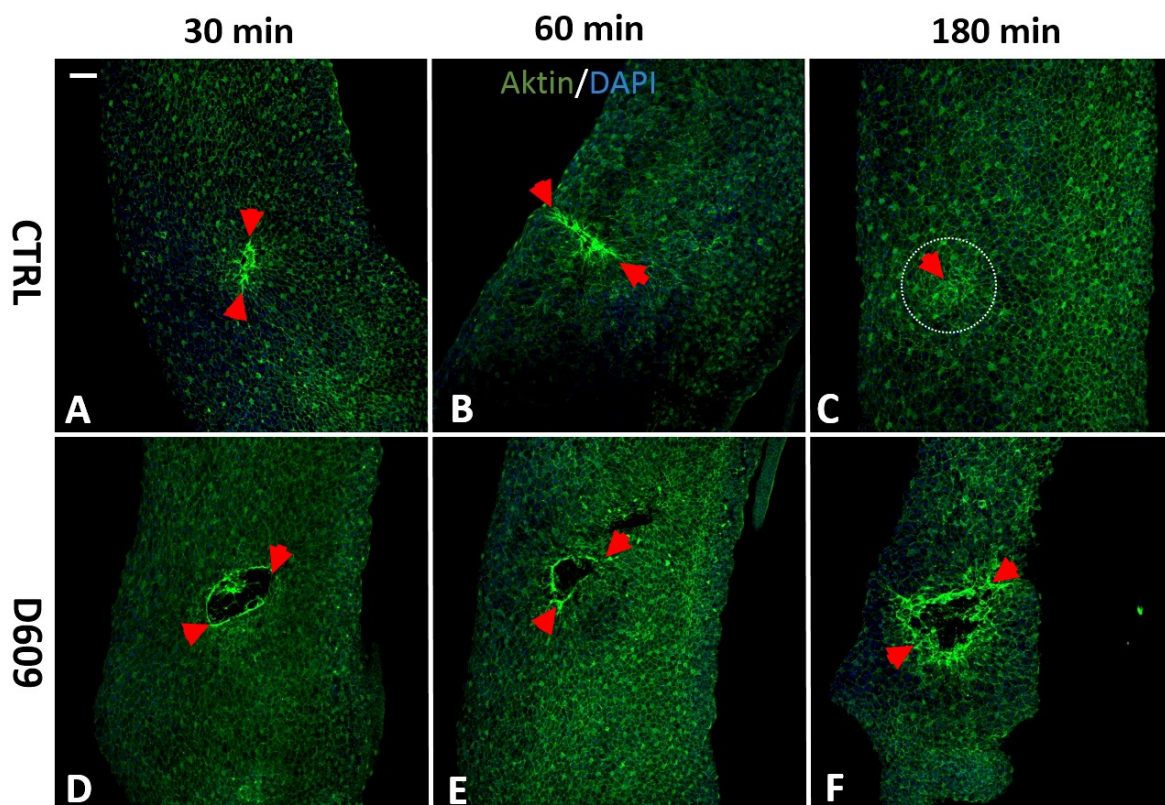


Obr. 6 Dokumentace uzavírání rány na makroskopu v reálném čase

Výběr z obrazové dokumentace ze záznamu hojení v reálném čase po injekci GFP do embryí ve stádiu 1. Červené šipky ukazují na ránu, která se postupně uzavírá.

4.2.1. Aktino-myosinový komplex

Znázornění aktinového prstence, který se tvoří při okrajích rány a následně ji s pomocí myosinu uzavírá, je znázorněno na **Obr. 7**. Pro pokusy s aktinem bylo barveno a analyzováno více než 100 embryí s různými časy od poranění (0, 15, 30, 60, 90, 120, 180, 360 min). Na obrázku jsou znázorněny vzorky, které byly ponechány se hojit po dobu 30, 60 a 180 min. Aktinové struktury byly srovnávány mezi kontrolními vzorky (**7A**, **7B**, **7C**) (kultivace v kontrolním médiu) a vzorky, které byly kultivovány s inhibítozem D609 (**7D**, **7E**, **7F**). Kontrolní vzorky byly po 180 min uzavřeny a na povrchu nebyly téměř známky po poranění (**7C**). Inhibované vzorky nevykazovaly proces hojení a uzavírání rány (**7D**, **7E**, **7F**), ovšem překvapivě množství F-aktinu po 180 min od zranění značně narostlo (**7F**) oproti nižším časům (**7D**, **7E**), či kontrolním vzorkům (**7A**, **7B**, **7C**).

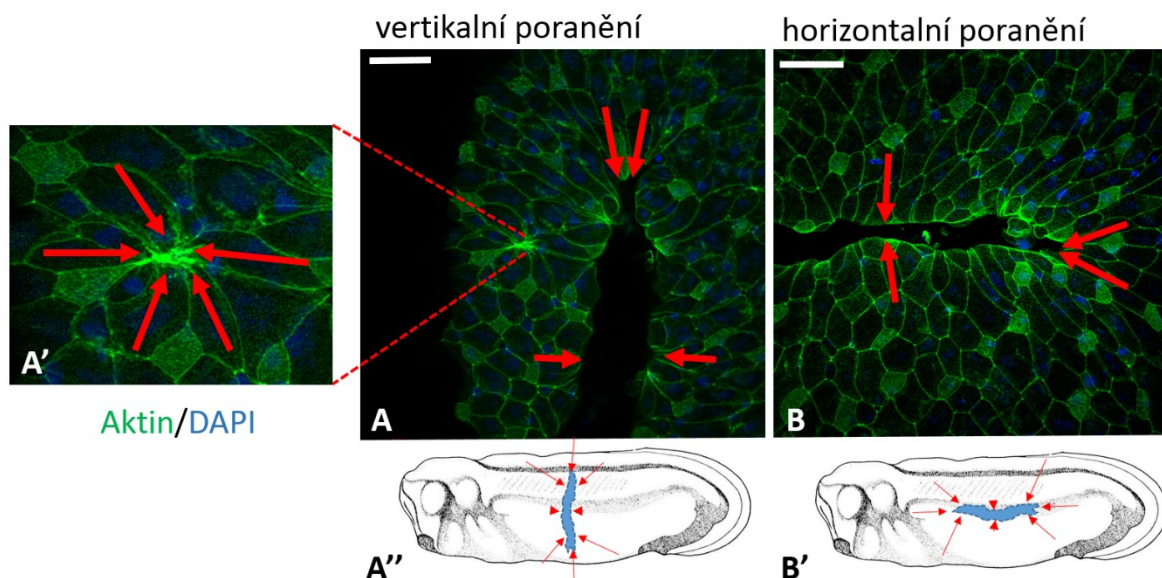


Obr. 7 Znázornění aktinových struktur podílejících se na uzavírání rány

Embrya byla poraněna ve stádiu 26 v rozdílných médiích a ponechána se hojit 30 min, 60 min a 180 min. Poté byla zafixována ve 4% PFA, imunohistochemicky nabarvena pro vizualizaci F-aktinu a pomocí DAPI nabarvena jádra. Při okraji rány jsou znázorněné zelené struktury F-Aktinu, který vytváří spolu s myosinem kontraktilní struktury, které uzavírají zranění. V případě kontrolních vzorků (A, B, C) je po 3 hodinách rána uzavřena (C) a stopy po zranění nejsou téměř znatelné (bílý kruh ohraničuje zranění). Naopak u vzorků ponechaných hojit se v inhibitoru D609 (D, E, F), k hojení nedochází ani po 3 h (F) a naopak oproti nižším časům (D, E), či kontrolám (A, B, C) množství F-aktinu znatelně narostlo. Měřítko (uvedeno v A) je 100 μ m.

4.2.2. Morfologie buněk při okraji rány

Embryonální hojení také souvisí se změněným tvarem buněk. Znázornění směru prodlužování buněk je demonstrováno v **Obr. 8**. Embrya byla poraněna dvojím způsobem (horizontálně a vertikálně). Byla ponechána se hojit a po uplynulé době 30 min zafixována. Pro znázornění struktur jednotlivých buněk byly zafixované vzorky imunohistochemicky nabarveny značeným Phalloidinem pro znázornění F-aktinu a jádra buněk pomocí DAPI. Vizualizace buněk proběhla v různých časových horizontech a na každou podmínku bylo analyzováno minimálně 5 embryí. Buňky se natahují a zavírají ránu od nejužšího místa, zároveň se buňky na opačných stranách poranění přibližují. Chování a polarizace buněk je totožná, ať je zranění horizontální (8A), vertikální (8B) či jednoduché bodnutí (8A').



Obr. 8 Vliv typu poranění na morfologii buněk

Embrya byla poraněna vertikálně či horizontálně na laterální části těla (schématicky znázorněno v A'' a B'). Byla ponechána se 30 min hojit a poté byla zafixována v 4% PFA. Následně byla imunohistochemicky nabarvena značeným phalloidinem na znázornění F-aktinu a pomocí DAPI nabarvena jádra (A', A, B). Morfologie buněk a směr jejich natahování je znázorněn červenými šipkami. Embrya byla ve stádiu 28. Měřítka (uvedeno v A, B) je 50 μ m.

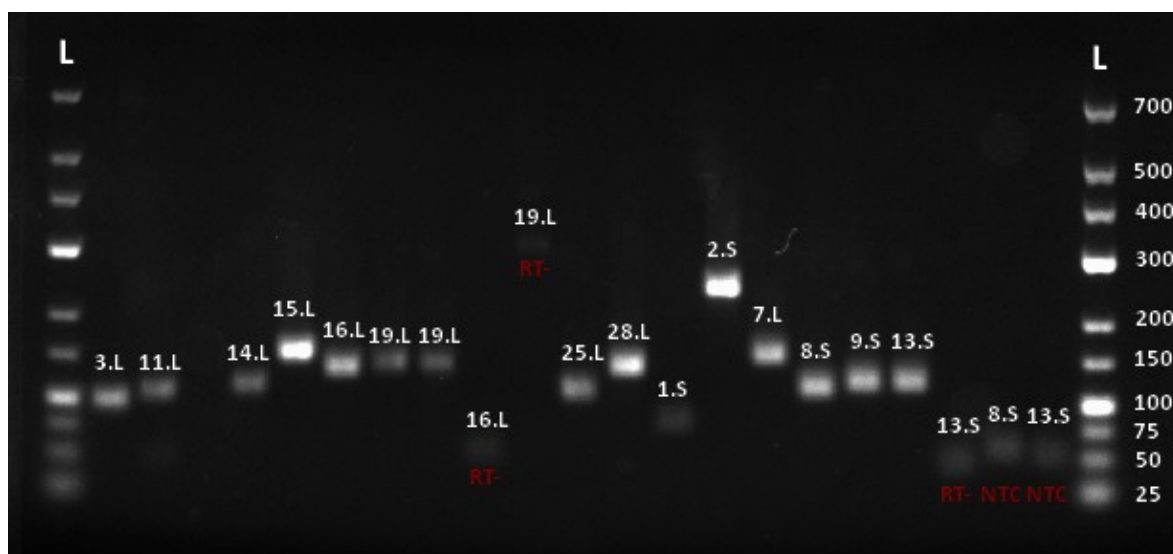
4.3. Genová exprese vybraných *mmp*

4.3.1. Testování primerů pro qPCR a prób pro *in situ* hybridizaci pro jednotlivé *mmp*

Na základě analýz RNA-Seq, provedených v minulosti v Laboratoři genové exprese, byly vybrány *mmp*, jako geny našeho zájmu. Na kontrolních vzorcích byl proveden test návrhu 15 primerů na vybrané *mmp*. Primery byly navrhnuty pomocí aplikace Primer-BLAST. Jednotlivé sekvence jsou uvedeny v **Příloze 1**.

Velikost qPCR produktů za použití navržených primerů, byla testována na gelové elektroforéze (**Obr. 9**) a srovnána s výsledky z Primer-BLAST. Výsledky z gelové elektroforézy potvrdily správný návrh primerů. Velikost produktů dle Primer-BLAST viz **Příloha 1**.

Na gelové elektroforéze byly testovány i próby pro *in situ* hybridizaci *mmp7* a *mmp9* (**Obr. 10**). Gelová elektroforéza potvrdila správně provedenou restrikci a dobrou kvalitu RNA prób. Produkt *mmp7* měl mít velikost 1074 bp a produkt pro *mmp9* velikost 3426 bp.

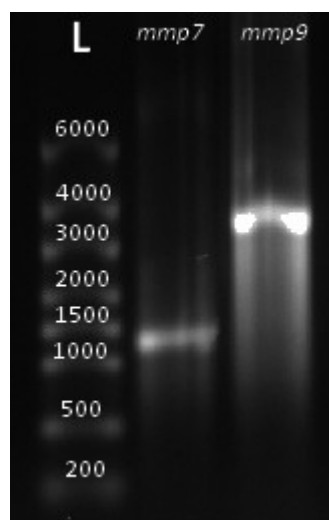


Obr. 9 Elektroforetogram qPCR produktů jednotlivých *mmp*

Primery pro 15 *mmp* (3.L-*mmp3.L*, ...) byly testovány na kontrolních vzorcích. Velikost jednotlivých qPCR produktů byla odečtena pomocí hmotnostního standardu (Ladder [bp]) o definované velikosti jednotlivých fragmentů a srovnána s výsledky z Primer-BLAST. Elektroforéza potvrdila správný design primerů.

RT- – negativní kontrola reverzní transkripce

NTC – negativní kontrola qPCR.



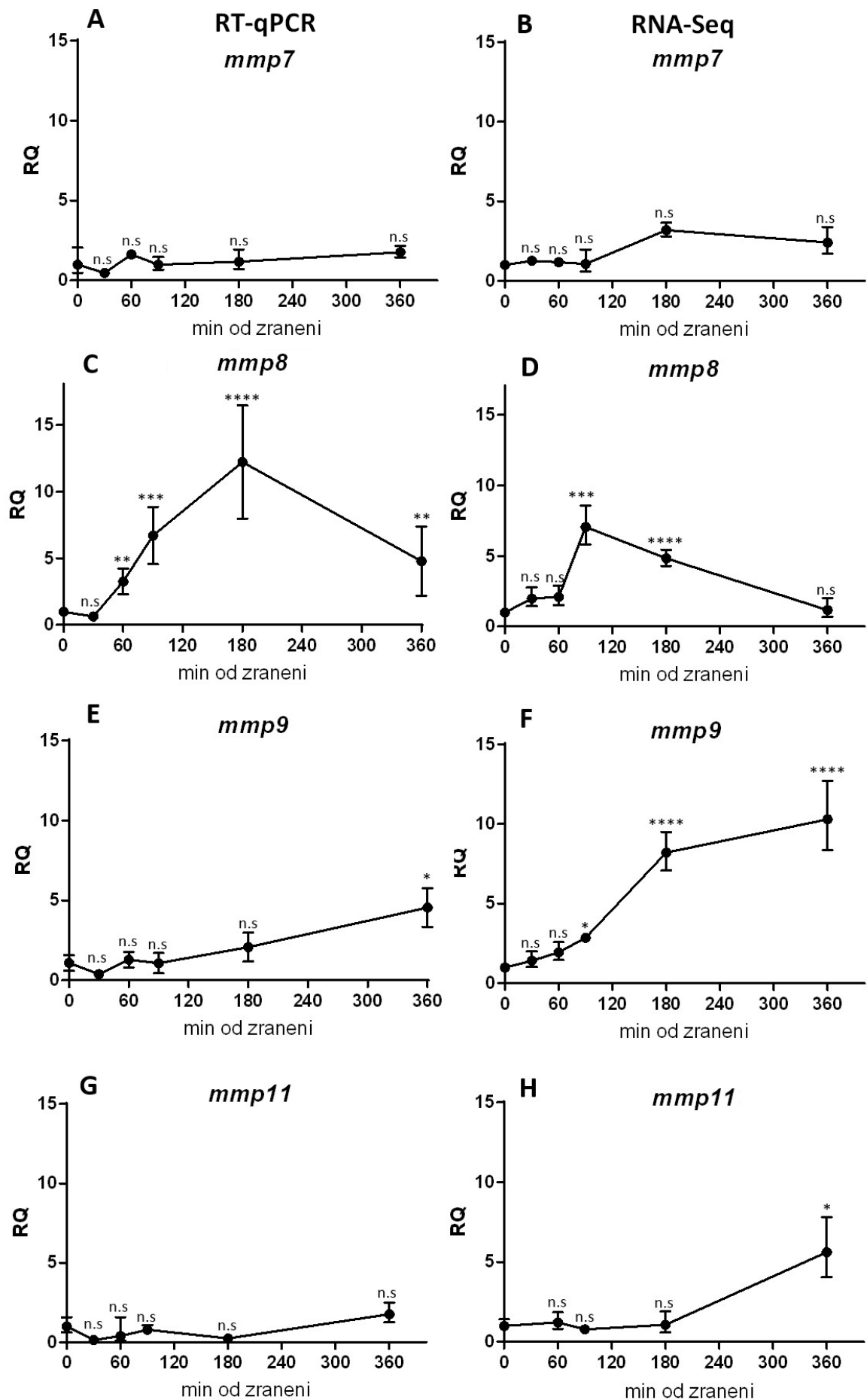
Obr. 10 Elektroforetogram ověření kvality prób pro *in situ* hybridizaci

Próby používané pro *in situ* hybridizaci *mmp7* a *mmp9* byly testovány pomocí denaturující gelové elektroforézy. Velikost jednotlivých produktů byla odečtena pomocí hmotnostního standardu (Ladder [bp]) o definované velikosti jednotlivých fragmentů, a srovnána s údaji od výrobce. Velikost produktu *mmp7* – 1074 bp; velikost produktu *mmp9* – 3426 bp.

4.3.2. Srovnání RNA-Seq a qPCR vybraných *mmp*

Pro qPCR analýzu bylo testováno 15 *mmp*. Byly využity navržené (viz **Příloha 1**) a otestované primery. Na základě těchto výsledků a srovnání s RNA-Seq, které proběhlo v minulosti v naší laboratoři, byly pro další studium vybrány *mmp7*, *mmp8*, *mmp9* a *mmp11*

(Obr. 11). Experiment proběhl na zraněných, kontrolních (neovlivněných) embryích. Pro každou časovou podmínku byl využit biologický triplikát, přičemž jeden replikát byl vytvořen odběrem tkáně ze 3 embryí. Data byla statisticky zhodnocena jednosměrnou analýzou rozptylu (one-way ANOVA Dunnett's multiple comparisons test) vůči času 0. Byla určena i standardní odchylka geometrického průměru (v grafu znázorněna pomocí chybových úseček (error bars)). V grafech je pozorován stejný trend, dochází ke zvýšení genové exprese po 1 h od zranění, tedy v době, kdy je embryo na povrchu téměř zacelené. V případě *mmp7* (**11A, 10B**), *mmp9* (**11E, 10F**) a *mmp11* (**11G, 11H**) dochází nárůstu genové exprese až po 3 h a vrchol je po 6 h. U *mmp8* je vrchol exprese po 60 – 180 min od zranění a poté exprese klesá.



Obr. 11 Srovnání genové exprese *mmp* neovlivněných, kontrolních embryí z RNA-Seq a qPCR analýzy

Byla provedena qPCR analýza *mmp7*, *8*, *9*, *11* (A, C, E, G). Výsledky pak byly srovnány s výsledky z RNA-Seq analýzy (B, D, F, H). V obou analýzách bylo potvrzeno, že vybrané *mmp* jsou aktivní v pozdější fázi hojení (1 h po zranění) a *mmp 9* a *11* (E, F, G, H) mají největší nárůst genové exprese po 3-6 h. Chybové úsečky (error bars) vyjadřují standardní odchylku geometrického průměru. Pro každou podmínku byl použit biologický triplikát, přičemž každý replikát obsahoval poraněnou tkáň ze 3 embryí. Experimentální data byla analyzována jednosměrnou analýzou rozptylu (one-way ANOVA Dunnett's multiple comparisons test) vůči času 0.

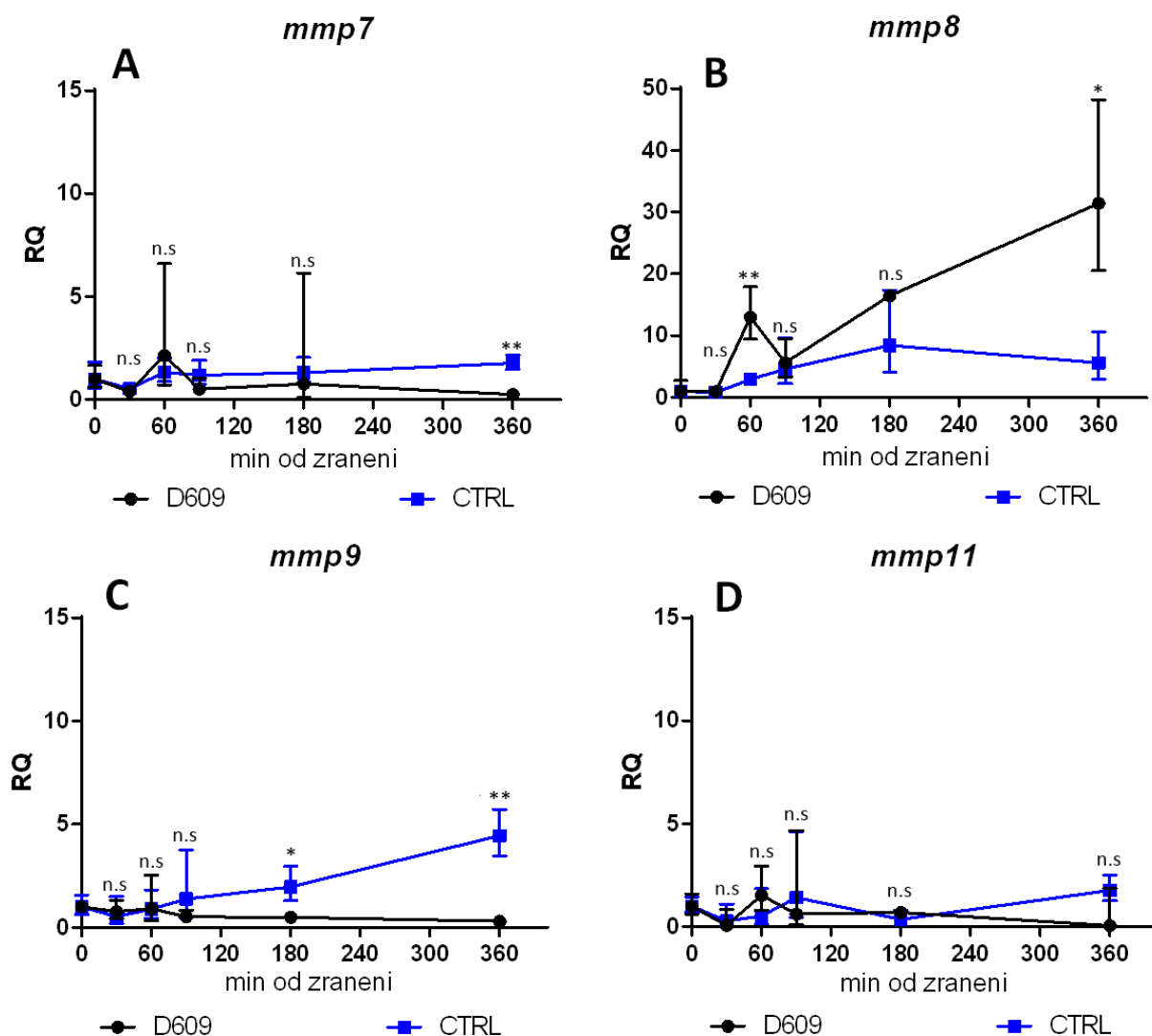
**** - $p < 0,0001$; *** - $p < 0,0002$; ** - $p < 0,0021$; * - $p < 0,0332$; n.s - $p > 0,0332$

4.3.3. Genová exprese *mmp* u inhibovaných a kontrolních embryí

Následně se přistoupilo k testování genové exprese u embryí, u kterých byl průběh hojení ovlivněn inhibitorem D609 (**Obr. 12**). Kvantita používané RNA byla změřena na přístroji Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific) a fluorospektrofotometrem Quibit 2.0 (Life Technologies). Pro vyloučení možného zkreslení výsledků exprese *mmp* z důvodu nekvality, byla kvalita používané RNA otestována primery na expresi genu *rpl1*, jehož expresní profil je v průběhu hojení konstantní. Pro otestování případné inhibice během RT byl měřen RNA spike (viz **Příloha 2**). Po ověření kvality a kvantity (výsledky nezveřejněny), bylo přistoupeno k qPCR analýze inhibovaných vzorků.

Experiment proběhl na zraněných, kontrolních (neovlivněných) embryích a na embryích zraněných a ponechaných se hojit v inhibitoru D609. Pro každou časovou podmínku byl využit biologický triplikát, přičemž jeden replikát byl vytvořen odběrem tkáně ze 3 embryí. Změna genové exprese u inhibovaných embryí vůči kontrolním pak byla statisticky vyjádřena studentovým nepárovým T-testem. Byla určena také standardní odchylka geometrického průměru (v grafu znázorněna pomocí chybových useček (error bars)).

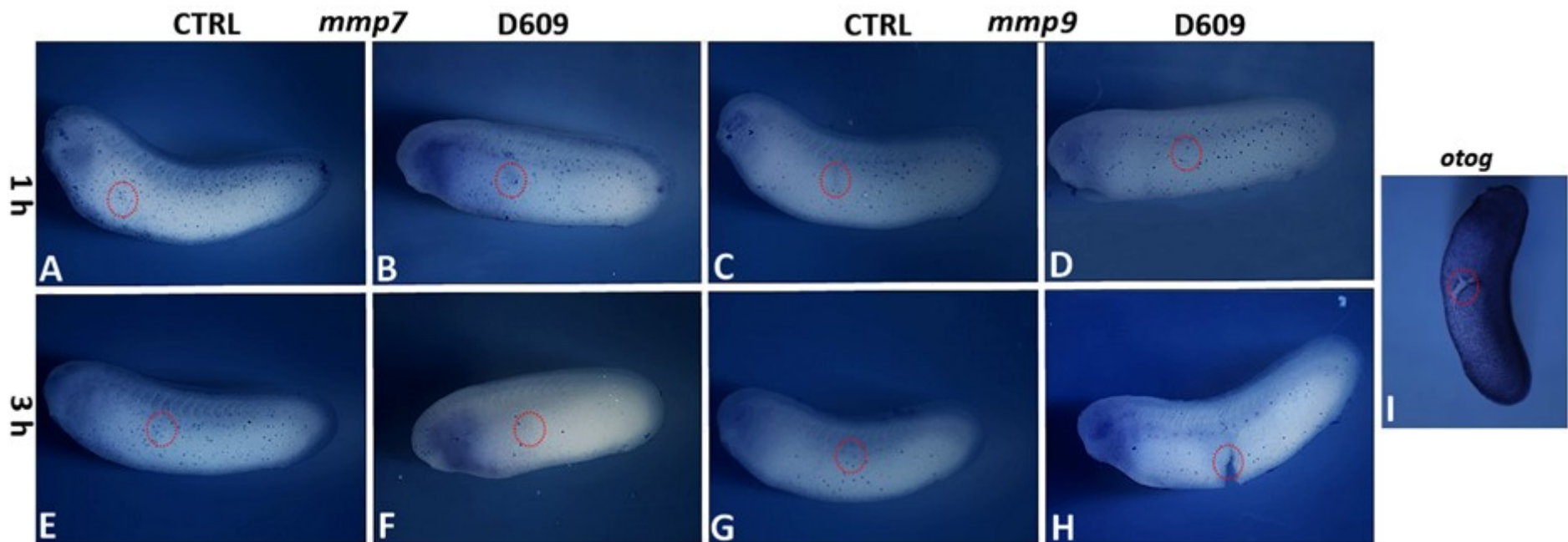
Genová exprese vybraných a v laboratoři dostupných *mmp* (7 a 9) byla kromě RT-qPCR testována také na prostorovou lokalizaci pomocí *in situ* hybridizace (**Obr. 13**). Jednotlivá embrya ve stádiu 24-26 byla poraněna v kontrolním (**13A, 13C, 13E, 13G**) a v médiu s inhibitorem D609 (**13B, 13D, 13F, 13H**). Po uplynulé době 60 a 360 min od poranění byla zafixována a poté podle protokolu (viz **3.6.3**) hybridizována se sondou na *mmp7* (**13A, 13B, 13E, 13F**) a *mmp9* (**13C, 13D, 13G, 13H**) a *otog* (**13I**). Poranění embryí je zaznačeno červeným kruhem. Lokalizace jednotlivých mRNA je znázorněna černými tečkami v embryu. Jako kontrola správně provedeného experimentu byl použit otogelin (*otog*), což je marker pokožkových buněk.



Obr. 12 Srovnání genové exprese *mmp* pomocí qPCR analýzy u embryí se zablokovanou schopností hojit se a u kontrolních embryí

Byla provedena qPCR analýza *mmp7* (A), *mmp8* (B), *mmp9* (C), *mmp11* (D) u kontrolních (modře) a inhibovaných vzorků (černě). Chybové úsečky (error bars) vyjadřují standardní odchylku geometrického průměru. Pro každou podmínku byl použit biologický triplicát, přičemž každý replikát obsahoval poraněnou tkáň ze 3 embryí. Změna genové exprese jednotlivých *mmp* v konkrétním čase vůči kontrolním vzorkům, byla analyzována studentovým nepárovým T-testem.

**** - $p < 0,0001$; *** - $p < 0,0002$; ** - $p < 0,0021$; * - $p < 0,0332$; n.s. - $p > 0,0332$



Obr. 13 Prostorová lokalizace exprimovaných *mmp7* a *mmp9* u poraněných (inhibovaných) embryí

Embrya ve stádiu 24-26 byla poraněna v rozdílných médiích a ponechána se hojit 1 h a 3 h. Poté byla zafixována v 4% PFA, hybridizována se sondou na *mmp7* (1 h, kontrola – A, 3 h kontrola – E; inhibitor 1 h – B, inhibitor 3 h – F), *mmp9* (1 h, kontrola – C, 3 h kontrola – G; inhibitor 1 h – B, inhibitor 3 h – F). Jako kontrola správně provedeného experimentu byla použita sonda pro otogelin (I). Genová exprese jednotlivých *mmp* je znázorněna jako tečky v embryu. Zranění je v červeném kruhu.

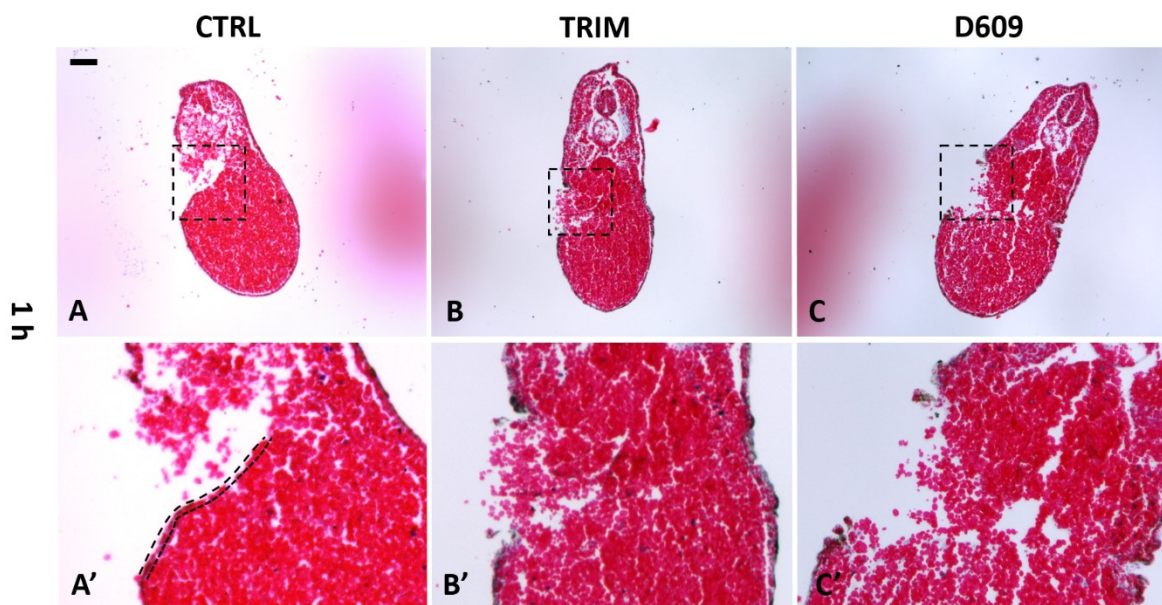
4.4. Bazální membrána při embryonálním hojení

Jelikož enzymy MMP degradují složky ECM a BM, byly pro další experimenty stanoveny komponenty laminin a kolagen.

4.4.1. Kolagenová vrstva

Hlavní složkou ECM a BM jsou kolageny. Pro zablokování hojení a syntézy kolagenové vrstvy byl využit inhibitor D609. Vizualizace kolagenové vrstvy v oblasti poranění je znázorněna na **Obr. 14**. Byl využíván kit Masson Trichrom (**viz 3.4.3**). Embrya ve stádiu 26 byla poraněna na laterální straně a ponechána se hojit 60 min v kontrolním médiu či v médiu s inhibitorem TRIM nebo D609. Následně byla fixována, zalita do parafinu, nařezána na 10 μ m řezy tak, aby byla obsáhlá oblast poranění a nabarveny kitem. Vzorky byly analyzovány makroskopem a poté programem ZEN (black edition) a PhotoFiltre 7.0. Pro mechanickou náročnost bylo na každou podmínku použito 20 embryí a více jak 20 řezů z každého embrya bylo nabarveno.

Poraněná oblast u kontrolních vzorků vykazuje po hodinu organizaci a obnovu kolagenové vrstvy (**14A, 14A'**), zatímco negativní kontrola (**14B, 14B'**) a sledovaný inhibitor (**14C, 14C'**) žádnou organizovanou obnovu nevykazují.



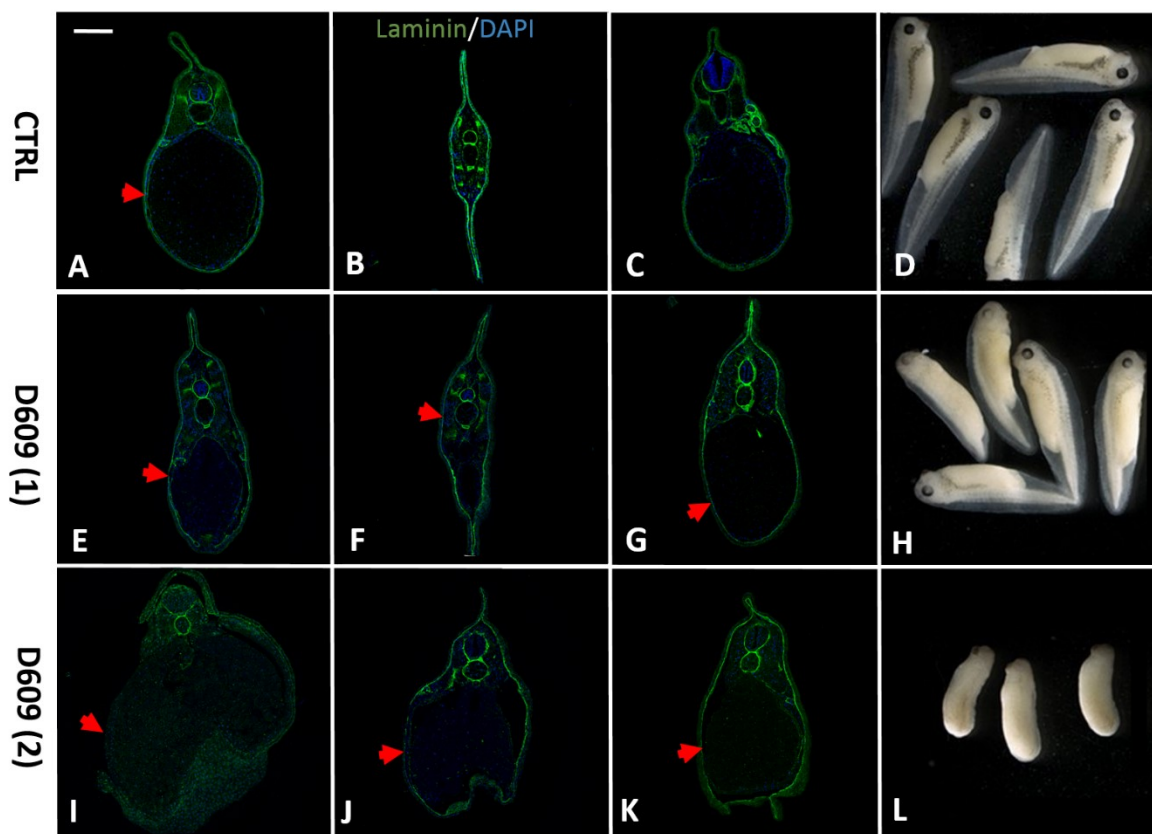
Obr. 14 Vliv inhibitoru D609 na kolagenovou vrstvu po zranění embryí ve stádiu 26

Embrya byla poraněna na ventrální, ponechána se 1 h hojit v kontrolním médiu (**A**), v inhibitoru TRIM (**B**) či D609 (**C**), následně byla zafixována v 4% PFA. Vzorky byly zality do parafinu, nařezány na 10 μ m řezy a nabarveny kitem Masson Trichrom. Poraněná část, zaznačená čtvercem, kontrolních vzorků (**A**), zaznačená v kruhu, vykazuje obnovu kolagenové vrstvy (zvýrazněná oblast v detailu zranění **A'**), zatímco negativní kontrola (**B**) a sledovaný inhibitor (**C**) po hodině od poranění nevykazují žádnou organizovanou obnovu kolagenů (detail zranění v **B'** a **C'**). Měřítka (uvedeno v **A, A'**) je 100 μ m.

4.4.2. Lamininová vrstva

Další hojně zastoupenou strukturou v ECM a BM jsou lamininy. I u těchto experimentů byl využíván inhibitor D609.

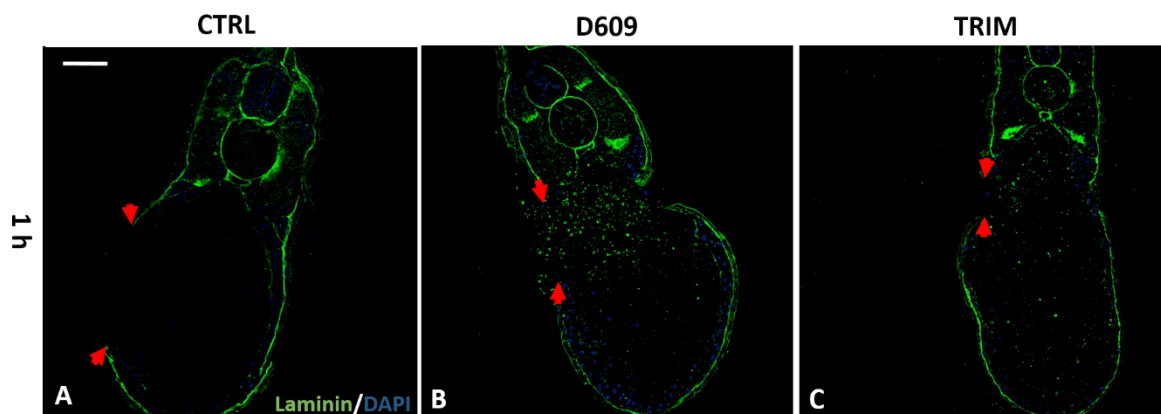
Nejprve byl proveden experiment na vývoj lamininové vrstvy. Embrya byla ve stádiu gastruly přenesena do média s inhibitorem a média kontrolního. Kontrolní médium obsahovalo přídavek DMSO (2 μ l/ml média 0,1x MBS+gentamicin) ve kterém je D609 rozpuštěn, aby byl prokázán vliv D609 a ne DMSO. Embrya byla ponechána se při pokojové teplotě 2 dny vyvíjet. Experiment je zdokumentován v **Obr. 15**. Po zafixování byla embrya zalita 4% agarózou, po zatuhnutí nařezána na 150 μ m řezy. A pomocí imunohistochemie byl vizualizován laminin. Lamininová vrstva (zelená) je znázorněná červenými šipkami. V případě kontrolních embryí (**15A, 15B, 15C**) je vidět jasná a nepoškozená lamininová vrstva. Byly použity dvě koncentrace inhibitoru. Nižší D609(1) (0,2 μ l/ml média 0,1x MBS+gentamicin), neměla příliš velký vliv na strukturu lamininové vrstvy, po vizualizaci byla jen méně zřetelná (**15E, 15F, 15G**). Použití vyšší koncentrace D609(2) (0,5 μ l/ml média 0,1x MBS+gentamicin), mělo vliv na strukturu a vytvoření lamininové vrstvy. Byla méně zřetelná a vykazovala odlišný fenotyp (**15I, 15J, 15K**). Embrya byla vyfocena i ve světelném poli pro zaznamenání vývoje. Vliv inhibitoru byl srovnáván s kontrolním vzorkem (**15D**). Při nižší koncentraci inhibitoru (**15H**) byl vývoj nepatrně zpomalen, avšak při použití vyšší koncentrace D609 (**15L**) byl vývoj embryí značně pomalejší.



Obr. 15 Vliv inhibitoru D609 na vývoj lamininové vrstvy bazální membrány u embryí

Embrya byla ve stádiu 10 (gastrula) přenesena do kontrolního média a do média s vyšší a nižší koncentrací inhibitoru D609. Byla ponechána se 2 dny vyvíjet a poté byla zafixována v 4% PFA (**D, H, L**). Vzorky byly umístěny do 4% agarózy, nařezány na 150 µm řezy a následně imunohistochemicky nabarveny pro vizualizaci lamininu a pomocí DAPI nabarvena jádra. Lamininová vrstva je znázorněná červenými šipkami. Řezy byly vedeny skrz embryo. V kontrolních embryích (**A, B, C**) je zřetelná a neporušená vrstva lamininu. Nižší koncentrace inhibitoru D609 (0,2 µl/ml média MBS 0,1x) neměla příliš velký vliv na vytváření lamininové vrstvy (**E, F, G**), avšak není tak zřetelná, jako u kontrolních vzorků a celkový vývoj embryí byl nepatrně zpomalen (**H**) oproti kontrolám (**D**). Vyšší koncentrace inhibitoru D609 (0,5 µl/ml média 0,1x MBS+gentamicin) měla vliv na vytvoření lamininové vrstvy (**I, J, K**) i na celkový vývoj embryí, který byl značně zpomalen (**L**). Měřítka (uvedeno v **A**) je 200 µm, zvětšení ve světelném mikroskopu (**J, K, L**) je 3x.

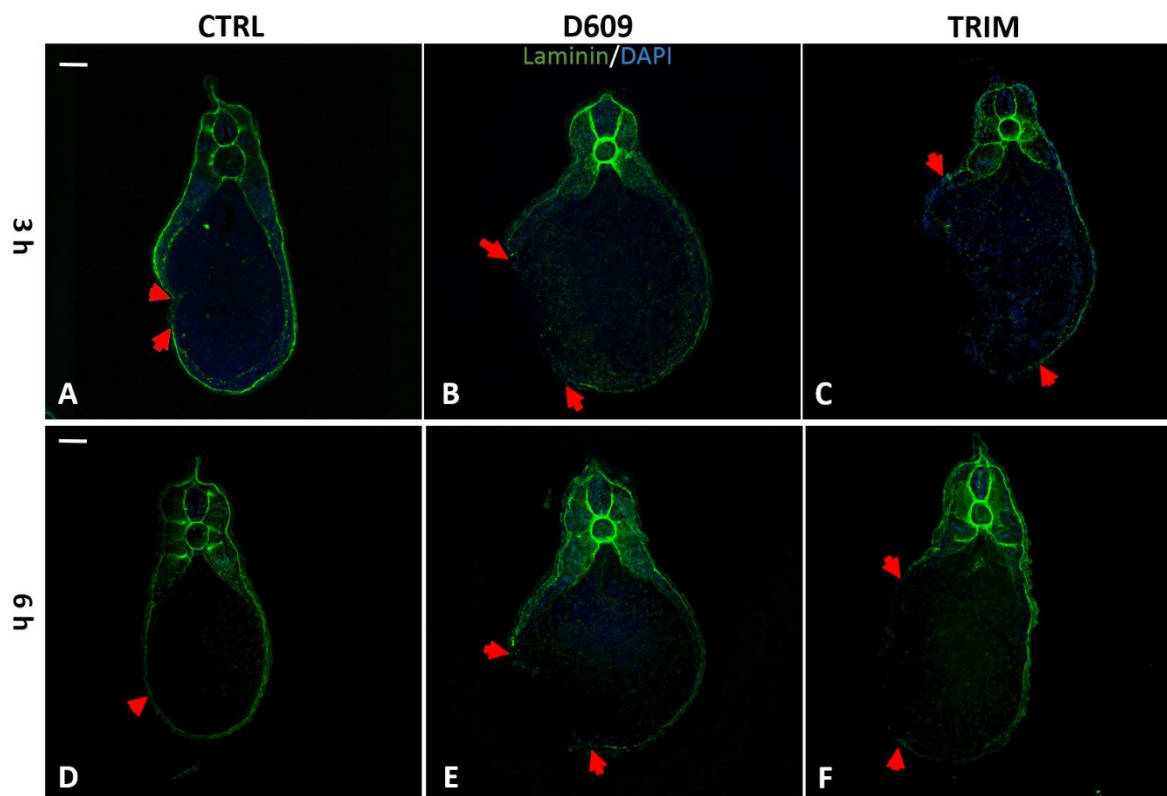
Následně se přistoupilo k experimentům s poraněním. Nejprve bylo provedeno sledování lamininové vrstvy 1 h po zranění (**Obr. 16**). Embrya byla ve stádiu 26 zraněna v kontrolním médiu, médiu s inhibitorem D609 a s inhibitorem TRIM (negativní kontrola hojení). Následně byla zafixována a imunohistochemicky nabarvena pro vizualizaci lamininu a jádra pomocí DAPI (**viz 3.4.2**). Kontrolní embrya (**16A**) jsou po 1 h na povrchu již téměř zacelena, avšak lamininová vrstva obnovena není. Embrya inkubovaná v inhibitech D609 (**16B**) a TRIM (**16C**) nevykazují žádné známky hojení, tedy jak uzavírání rány na povrchu, tak obnovu lamininové vrstvy.



Obr. 16 Rekonstrukce lamininové vrstvy 1 hodinu od poranění

Embrya ve stádiu 26 byla poraněna v rozdílných médiích (kontrolní, s inhibitorem D609 a s inhibitorem TRIM) a ponechána se 1 h hojit. Poté byla zafixována v 4% PFA, nařezána na 150 μm řezy a následně imunohistochemicky nabarvena pro vizualizaci lamininu a pomocí DAPI nabarvena jádra. Neovlivněné embryo je po 1 hodině od poranění téměř zacelené, avšak lamininová vrstva stále není obnovena (A). Embrya ovlivněná trimem jako negativní kontrola (B) a D609 (C) nejsou zhojena na povrchu a nemají ani obnovenou lamininovou vrstvu. Měřítka (uvedeno v A) je 100 μm .

Následovaly experimenty s delší dobou hojení pro sledování obnovy lamininové vrstvy (Obr. 17). Embrya ve stádiu 26 byla poraněna v kontrolním médiu, médiu s inhibitorem D609 a s inhibitorem TRIM. Po 3 a 6 hodinách proběhla fixace a vizualizace lamininové vrstvy a jader (viz 3.4.2). Embrya, která byla ponechána se hojit v kontrolním médiu, byla již po 180 min na povrchu zcela zacelena (17A), avšak lamininová vrstva ještě nebyla zcela obnovena. Kontrolní vzorky po 6 h vykazují již obnovenou lamininovou vrstvu (17D). Embrya inkubována v D609 (17B, 17E) neměla obnovenou lamininovou vrstvu a nehojila se ani na povrchu, stejně jako negativní kontrola hojení TRIM (17C, 17F).



Obr. 17 Rekonstrukce lamininové vrstvy 3 a 6 hodin od poranění

Embrya ve stádiu 26 byla poraněna v rozdílných médiích a ponechána se 3 a 6 h hojit. Poté byla zafixována v 4% PFA, nařezána na 150 μm řezy a následně imunohistochemicky nabarvena pro vizualizaci laminininu a pomocí DAPI nabarvena jádra. Neovlivněná embrya po 3 hodinách od poranění jsou na povrchu zacelena, avšak lamininová vrstva stále není plně obnovena (A). Embrya ovlivněná D609 (B) a inhibítorem TRIM (C) nejsou zhojena jak na povrchu, tak nemají obnovenu lamininovou vrstvu. Kontrolní embrya po 6 hodinách od poranění jsou na povrchu kompletně zahojená, lamininová vrstva je obnovena, avšak ne zcela (D). Embrya ovlivněná D609 (E) a TRIM (F) nejsou zhojena na povrchu a nemají ani obnovenu lamininovou vrstvu. Měřítka (uvedeno v A) je 100 μm .

5. Diskuze

Schopnost zahojit a zacelit zranění je nezbytností pro přežití všech organismů. Kůže, jakožto ochranná bariéra, je nejčastěji zraněnou částí těla. Hojení u dospělých savců vede k zjizvení či vlivem různých endogenních a exogenních faktorů až k nehojícím se chronickým ranám (Guo et DiPietro 2010; Thiruvoth et al. 2015). Embryonální hojení je naproti tomu mnohem efektivnější, protože embrya dokáží kožní rány uzavřít a zahojit mnohem rychleji. A co je nejpodstatnější rozdíl – dokáží svá zranění zacelit tak efektivně, že nevykazují žádné pozůstatky ve formě jizev. Výsledkem je dokonalé nahrazení zdevastované tkáně (Ferguson et O’Kane 2004; Yokoyama et al. 2011). Navzdory silné klinické potřebě navodit hojení bez jizev, či alespoň využít poznatků efektivního embryonálního hojení k lepšímu zacelování ran, nejsou molekulární mechanismy vedoucí k dokonalé regeneraci zatím zcela pochopeny. Mnoho různých modelových organismů bylo studováno pro hlubší porozumění procesů, vedoucích k dokonalému zahojení. Jako velice slibný model regenerativní medicíny se jeví obojživelníci, kteří vykazují vysokou regenerační schopnost po celý život (Godwin et Rosenthal 2014). Velkou pozornost si zaslouží zejména žáby, které stejně jako savci ztrácí schopnost plně zahojit svá zranění v pozdních vývojových stádiích (po metamorfóze) (Beck et al. 2009). Pro studování efektivního embryonálního hojení na úrovni molekulárních i buněčných procesů, byla v této práci vybrána časná vývojová stadia organismu *Xenopus laevis*, disponující stále schopností zhojit svá zranění bez jizev.

Pro studium hojení byl v této práci využíván inhibitor D609 (Tricyclodecan-9-yl-xanthogenate) (Calbiochem). Jedná se o chemikálii využívanou k negativnímu ovlivnění BM. D609 blokuje syntézu kolagenu BM, čímž blokuje také angiogenezi (Haralabopoulos et al. 1994). Našel uplatnění i jako protinádorová látka (Zhang et al. 2005). Jedná se o specifický inhibitor fosfatidylcholin specifické fosfolipázy (PC-PLC). Jelikož pro enzymatickou aktivitu PC-PLC je důležitý Zn^{2+} , je pravděpodobné, že inhibice je možná i pomocí chelatačních vlastností D609 (Adibhatla et al. 2012). Díky tomu by měl D609 působit jako nespecifický inhibitor Zn^{2+} dependentních MMP. Publikace Shum et al. (2002) prokázala inhibici MMP-13 (kolagenáza) při použití inhibitoru D609. Jelikož se substráty kolagenáz (MMP-1; MMP-8; MMP-13), gelatináz (MMP-2; MMP-9), stromelysin (MMP-3; MMP-10; MMP 11) a matrilysin (MMP-7; MMP-26) překrývají, očekávali jsme inhibici i dalších MMP. Protože je v naší laboratoři dlouhodobě studován vliv oxidu dusnatého (NO) na hojení a regeneraci (Abaffy 2019 v přípravě) a efekt inhibitoru byl prokázán i na indukibilní NO syntázu (Matteson et al. 1999), bylo použití inhibitoru D609 vyhodnoceno jako nejlepší. Kombinoval efekt jak na

hojení, tak na BM a MMP. Po provedení optimalizačních testů byla stanovena pro další experimenty koncentrace 0,2 mM, kdy se embrya nehojila, avšak stále přežívala.

Embryonální hojení je umožněno díky kontraktilním strukturám známým jako aktino-myosinový komplex. Ten koordinuje buněčnou migraci a adhezi a přibližuje okraje rány (Martin et Lewis 1992a; Danjo et Gipson 1998). Aktino-myosinový komplex a jeho úloha při embryonálním hojení byla prokázána i v této práci. Zajímavé zjištění bylo, že u nehojících se embryí, u kterých byl použit inhibitor D609, byl pozorován velký nárůst aktinu po 6 h od poranění. Součástí aktivační signalizace aktin-myosinem řízenými kontrakcemi je jak NO, tak PC-PLC (Makhlouf et Murthy 1997). Tento jev proto může souviset se zablokováním syntézy NO (stejný efekt bylo pozorováno i při použití inhibitoru TRIM (inhibitor NO syntázy) (Abaffy 2019 v přípravě).

Embryonální hojení souvisí také se změněným tvarem buněk. Klíčovou úlohu hrají buňky při okraji rány. Právě jejich orientované protažení a myosinem řízené kontrakce umožňují opětovnou epitelizaci rány (Razzell et al. 2014). Hojení ran je podobné v mnoha ohledech embryonálnímu vývoji (Wood et al. 2002). Při vývoji embryonálního těla se podél jednotlivých os vytvářejí gradienty biologických molekul, které aktivují příslušné geny. Byla proto stanovena hypotéza, že stejně jako při vývoji (Goldstein et Freeman 1997), tak i u poranění je důležitá osa vedeného zranění (anterior-posteriorní/horizontální či dorzo-ventrální/vertikální) pro směr a způsob prodlužování buněk při zavírání rány. Podobný výzkum byl již proveden přímo na embryích *Xenopus laevis* výzkumnou skupinou Yoshii et al. (2005). Embrya byla v práci této japonské skupiny rozříznuta napůl a byla pozorována osa hojení, polarita a motilita buněk. Výsledkem byla převažující dorso-ventrální polarita buněk při uzavírání rány. V této práci byla embrya poraněna na laterální části těla horizontálně, vertikálně a jednoduchým bodnutím. Hypotéza důležitosti typu poranění na způsob a polaritu buněk při zavírání rány byla na základě výsledků této práce vyvrácena. Pomocí aktinového barvení byly vizualizovány jednotlivé buňky při procesu hojení. Polarizace a způsob hojení byl shodný ať už bylo zranění horizontální, vertikální či provedeno pouhým bodnutím. K zavírání docházelo vždy od nejužšího místa zranění a bylo pozorováno přibližování buněk na opačných stranách poranění k sobě (efekt „zapínání zipu“). Původní hypotéza byla tedy vyvrácena. Těchto experimentů na sledování motility buněk bylo provedeno asi dvacet a kromě fixace 30 minut po zranění byly analyzovány podmínky i 45, 60, 90, 180 a 360 minut po poranění (výsledky nezveřejněny). Na každou časovou podmínku bylo použito minimálně 5 embryí. Hojící se embrya byla pozorována i v reálném čase, v tomto případě proběhla vizualizace injekcí fluorescenčního

GFP proteinu do právě oplodněného embrya. Efekt „zipu“ byl pozorován ve všech případech. Je možné, že se buňky sice chovají stále stejně a polarita a motilita se nemění, avšak stejně jako při vývoji i u hojení, mohou působit různé gradienty aktivace genů. Jistě by stálo za vyzkoušení, zda se neliší genová exprese jednotlivých *mmp* v různých časech při odlišně vedených poranění či alespoň mRNA lokalizace při *in situ* hybridizaci.

Na základě výsledků z RNA-Seq, provedeného v minulosti v Laboratoři genové exprese, byly pro další studování vybrány geny pro enzymy MMP. Bylo zjištěno, že ačkoliv se poraněná embrya zdála již zahojená, exprese několika *mmp* byla zvýšená. Byla proto stanovena hypotéza, že některé MMP mohou hrát roli ve vnitřní remodelaci, tedy v době, kdy je embryo na povrchu již zacelené. Po návrhu a otestování primerů na všechny geny pro MMP, vyskytující se u *Xenopus laevis*, byly vybrány *mmp7*, *8*, *9* a *11*. Bylo provedeno RT-qPCR s navrženými primery na neovlivněných embryích. Následně proběhlo srovnání s RNA-Seq testováním. Výsledky se shodovaly s předchozí RNA-Seq, exprese jednotlivých *mmp* byla zvýšená v pozdních fázích hojení (3-6 h). Tyto MMP by měly být součástí kaskády vedoucí k efektivní regeneraci tkáně bez tvorby jizvy.

Je známo, že MMP mohou přispět k zjizvení a fibróze buď přímou degradací ECM nebo nepřímo ovlivněním buněčné aktivity (proliferace, genové exprese, přežití buněk) (Giannandrea et Parks 2014). Bylo ovšem také prokázáno, že některé MMP by mohly hrát roli v zmírnění zjizvení a tvorbě fibrózy. Jak nadměrná exprese, tak cílená delece *mmp8* snižuje jaterní (Siller-López et al. 2004) a plicní fibrózu (García-Prieto et al. 2010). Při ztrátě *mmp8* (u myši) je při hojení kožní rány zvýšená signalizace TGFβ, zpomalené uzavírání rány a infiltrace neutrofilů (Werb et al. 2007). To naznačuje, že MMP-8 je důležitá pro hladší průběh hojení a zmírnění zjizvení (Manuel et Gawronska-Kozak 2006). Při RT-qPCR analýze byla pozorována zvýšená exprese *mmp8* po 1 a 3 h od zranění. Poté nastával pokles. Nejvyšší genová exprese byla v samotném kroku uzavírání rány. Při použití inhibitoru D609 exprese *mmp8* stále rostla a nedošlo k snížení v pozdních časech od zranění, jako u kontrolních vzorků. Možným vysvětlením by mohlo být, že byla stále větší snaha ránu uzavřít. Tato MMP tedy nejspíš není ani tak důležitá v pozdější vnitřní remodelaci, jako při samotném uzavírání rány. *Mmp8* se chovala odlišně od ostatních *mmp* (7, 9, 11), jejichž genová exprese byla při použití inhibitoru nejprve zvýšená (po 1 h) a poté se postupně snižovala. Vysvětlením by mohlo být, že jakmile rána nebyla povrchově uzavřena, a byl narušen kontakt s BM a buněčný pohyb, exprese genů (*mmp7*, *9* a *11*) a související aktivita MMP potřebných až v pozdějších fázích hojení, se snižovala až nakonec úplně ustala. MMP-9 by se mohla podílet v několika klíčových oblastech

hojení ran. Od rozvolnění kotvených keratinocytů na bazální membránu přes remodelaci ECM pro snadnější migraci, až po konečnou fázi vnitřní remodelace (Armstrong et al. 2002). Role MMP-9 je však sporná, reguluje jak akutní, tak chronické poškození (Reiss et al. 2010). Nejspíš hraje zásadní roli při reorganizaci kolagenu během hojení (hlavní substrát je kolagen IV). Syntéza, aktivace a aktivita MMP-9 jsou zčásti regulovány TNF- α (Han et al. 2001). Chronické, nehojící se rány souvisí s probíhajícím zánětem. S tím souvisí uvolňováním TNF- α , což poskytuje mechanismus pro pokračování produkce MMP-9. Je možné, že při normálním hojení MMP-9 usnadňuje reepitelizaci degradací BM. Tím se umožní migrace keratinocytů do rány a zacílí se zranění. V situacích, kdy zánět pokračuje, TNF- α a MMP-9 přetrvávají, to zabraňuje migrujícím keratinocytům vytvářet nové vazby na nově syntetizovanou bazální membránu. Tato hypotéza vysvětluje přítomnost MMP-9 v případě abnormálního i normálního hojení (Reiss et al. 2010). Expres *mmp9* byla zvýšená v kontrolních embryích, ale snižena při použití inhibitoru. Jelikož je na základě literatury aktivita MMP-9 zvýšená při normálním i narušeném hojení, bylo očekáváno, že i genová exprese *mmp9* bude zvýšená. Může to souviset s tím, že embryonální hojení se v mnohém liší od hojení dospělců. Embrya nemají téměř žádný imunitní systém a nedisponují normální zánětlivou reakcí (Bullard et al. 2003; Redd et al. 2004), která by zvyšovala expresi *mmp9*. S tím souvisí i funkce MMP-7, která se uplatňuje zejména při zánětu při migraci buněk. Myši deficientní na *mmp7* mají nejzávažnější defekty v opravě ran u MMP „knock-out“ myši (Gill et al. 2008). O funkci MMP-11 během hojení toho není mnoho známo (Caley et al. 2015). Je pouze prokázáno, že exprese *mmp11* je během hojícího procesu zvýšená (Sabino et al. 2015) a enzym MMP-11 by tak mohl být důležitý až v pozdních fázích. Důvodem poklesu exprese *mmp7*, *9*, *11* a zvýšení exprese *mmp8* u inhibovaných embryí v RT-qPCR analýze, mohl být také problém s celkovým stavem zraněných embryí po 6 h v inhibitoru. Embrya mohla umírat a v takovém patologickém stavu může organismus vysílat zmatené signály.

Kromě RT-qPCR byly *mmp7* a *mmp9* testovány také pomocí *in situ* hybridizace pro vizualizaci lokalizace. Jelikož se jedná o MMP zánětu, byla očekávána migrace do poranění. Studie McGuire et al. (2003) naopak pozorovala, že MMP-7 v plicích štěpí E-kadherin při procesu usnadnění buněčné migrace pryč od okraje poraněné tkáně. O podobnosti plicního epitelu a pokožky organismu *Xenopus laevis* pojednávají práce Sim et al. (2018) a Tomankova et al. (2017), proto byla očekávána i tato varianta. Bohužel ať už v inhibovaných či v kontrolních embryích nedošlo k žádné zvláštní lokalizaci vizualizovaných *mmp* do poranění nebo od poraněné tkáně pryč. Inhibovaná embrya vykazovala menší expresi *mmp7* a *mmp9*,

avšak ani u kontrolních či inhibovaných není pozorován trend v lokalizaci. Pro kontrolu správně provedené analýzy, byl použit i kontrolní gen *otog* pro protein otogelin, který je hojně využívaný jako marker pokožkových buněk. Ten vyšel podle očekávání. Analýza byla na základě tohoto výsledku zhodnocena jako správně provedená. Próby pro *in situ* hybridizaci pro jednotlivé MMP, byly testovány denaturující gelovou elektroforézou pro kontrolu kvality s uspokojivými výsledky. Nic nenasvědčuje chybě v provedené analýze, avšak výsledky jsou i tak nejednoznačné.

Hlavní funkcí MMP je degradace a odstranění poškozené ECM během zánětlivé fáze, rozpad BM pro angiogenezi a buněčnou migraci v proliferační fázi a remodelace tkáně v remodelační fázi. Oprava BM během hojení ran je důležitá pro obnovení funkčních vlastností kůže po zranění. Byla tedy stanovena hypotéza, že správná struktura BM je nezbytností pro správný průběh hojení. Pro další experimenty byly vybrány dva komponenty ECM a BM, které jsou zároveň substráty studovaných MMP – laminin a kolagen.

Protein laminin se váže přímo na molekuly buněčného povrchu, jako jsou integriny a dystroglykany. Tyto interakce na povrchu buněk zvyšují lokální koncentraci lamininu na podporu polymerace v buněčných membránách. To se jeví jako první krok tvorby nové BM (Li et al. 2017). Nejprve byl proveden experiment mapující vývoj BM. Pomocí imunohistochemie byla vizualizována lamininová vrstva. Embrya ve stádiu gastruly byla přenesena do inhibitoru D609 o různých koncentracích a byla ponechána se vyvíjet. Celkový vývoj byl zpomalen a po vizualizaci BM byly pozorovány defekty v lamininu. Tvorba BM je tedy předpokladem pro normální vývoj a funkci tkáně (Smyth et al. 1999).

Kolageny jsou nejhojněji zastoupená skupina proteinů v ECM. Abnormální remodelace a reorganizace kolagenu během hojení je jedním z nejdůležitějších faktorů přispívajících k defektům při tvorbě jizev (Xue et Jackson 2013). Jak již bylo zmíněno výše, zastoupení typu kolagenů je rozdílné v embryích (nejhojněji kolagen IV) a u dospělých (kolagen I). Byl proveden experiment pro vizualizaci kolagenové vrstvy ve zraněných embryích po hodině od zranění. Pokus byl proveden jak na kontrolních embryích, tak na ovlivněných inhibitorem D609, který působí přímo na blokaci syntézy kolagenu IV. U kontrolních embryí jde vidět jasná restrukturalizace kolagenové vrstvy již 1 h od poranění. U inhibovaných embryí je vidět pouze neorganizované rozrušení vrstvy. V případě vizualizace lamininu není po 1 h od poranění ani náznak obnovy lamininové vrstvy. Ta se plně obnovuje až po 6 h od poranění. Lze tedy říci, že se kolagen syntetizuje dříve než laminin. Tyto výsledky jsou shodné s prací Ramos-Lewis et al. (2018) a naznačují nový pohled na syntézu BM. Bylo by vhodné pokus s kolagenovou vrstvou

rozšířit na více časových podmínek. Kvůli velké časové a manuální náročnosti experimentu bylo přistoupeno pouze k vizualizaci kolagenové vrstvy 1 h od poranění.

Přestavba ECM v pozdějších stádiích hojení při remodelaci má svou obdobu v nádorech. Rakovinná tkáň, aby podpořila svůj vlastní růst a invazivitu, má změněnou okolní matrix (Sundaram et al. 2018). Šíření rakovinných buněk z primárního nádoru do vzdáleného místa, známé jako metastázy, jsou hlavní příčinou mortality u pacientů s rakovinou. Metastáza je velmi komplexní buněčný proces, který zahrnuje mnoho kroků, včetně porušení BM, aby se umožnil pohyb buněk tkáněmi. K porušení BM dochází prostřednictvím vysoce regulované a lokalizované remodelace ECM, která je zprostředkována tvorbou struktur, známých jako invadopodie, a cílené sekrece MMP (Jacob et Prekeris 2015). Mnoho studií prokázalo, že právě MMP jsou odpovědné za ztrátu architektury BM (Tanjore et Kalluri 2006). Proteiny laminin a kolagen IV, hojně zastoupeny v BM, poskytují substrát pro adhezi migrujících rakovinných buněk. Nedávné studie ukázaly, že MMP-9 je zapotřebí pro mobilizaci VEGF a iniciaci nádorové angiogeneze (Bergers et al. 2000). Exprese MMP se zvyšuje s rostoucí velikostí nádoru, a hladiny MMP v séru a moči jsou užitečným indikátorem progresu rakoviny a metastáz (Yan et al. 2001). Všechny hlavní signální dráhy, podílející se na hojení ran, jsou také aktivní při rakovině (Arnold et al. 2015). Zánět, jakožto zásadní událost v odpovědi na hojení, je klíčovým faktorem i u rakoviny (Balkwill et Mantovani 2001). Stejně tak zvýšená proliferace a migrace rakovinných buněk je velmi podobná chování epiteliálních buněk při zranění (Schäfer et Werner 2008). Polymerace aktinu při hojení, pozorovaná a prokázána i v této práci, je důležitým krokem v tvorbě a funkci invadopodií, uplatněných při motilitě invazivních buněk (Pollard et Borissy 2003). Fyziologie hojení ran je velmi podobná té, která se podílí na progresu rakoviny. Zájem o paralely mezi hojením ran a rozvíjejícím se nádorem pochází již z 19. století a poprvé byl popsán ve spisech Rudolfa Virchowa (Virchow 1858). V další, dnes již klasické publikaci Dvorak (1986), byly tumory popsány jako rány, které se nehojí.

Studium embryonálního hojení ran by tedy nemuselo do budoucna znamenat jen pokrok v efektivnější léčbě zranění, ale také by mohlo pomoci při formulaci lepších strategií v boji s rakovinou.

6. Shrnutí a závěr

Předkládaná diplomová práce se zabývá embryonálním hojením ran. V první části práce je za použití uvedené literatury vypracována literární rešerše. V té je popsán proces hojení rány u dospělého jedince a embrya, molekulární regulace hojení, úloha MMP a BM. Cílem této práce bylo studium embryonálního hojení ran na molekulární i buněčné úrovni u embryí modelového organismu *Xenopus laevis*. V druhé části práce pak bylo pomocí zvolených metod studováno:

- Mechanismus uzavírání rány (aktino-myosinový komplex, polarita a motilita buněk při procesu zavírání).
- Proteiny BM - kolagen a laminin.
- Enzymy MMP, degradující komponenty ECM i BM.

Pro inhibici hojení byl využíván inhibitor D609. Výsledky z provedených experimentů lze shrnout:

- Byla připravena a následně injikována RNA kódující mem-GFP do oplodněných embryí pro sledování hojení v reálném čase.
- Pomocí imunohistochemických a mikroskopických metod byly vizualizovány proteiny aktin, kolagen, laminin.
 - Byla potvrzena tvorba aktino-myosinového komplexu při hojení. Při užití D609 byl po 6 h pozorován velký nárůst aktinu v místě poranění.
 - Polarita a motilita buněk nezáleží na typu vedeného zranění (horizontální, vertikální).
 - Již po 1 h od zranění je pozorovatelná organizovaná obnova kolagenu.
 - D609 měl vliv na vývoj embryí a BM (lamininu).
 - Lamininová vrstva v oblasti poranění se obnovuje až po 6 h od zranění.
- Byly navrženy primery pro RT-qPCR a připraveny próby pro *in situ* hybridizaci na vybrané *mmp*.
- Pomocí RT-qPCR byla otestována exprese 15 *mmp* u *Xenopus laevis*.
 - Byly vybrány geny *mmp7*, *mmp8*, *mmp9*, *mmp11*, u kterých byla zvýšená genová exprese po 3-6 h od zranění.
 - U nehojících se embryí byla po použití inhibitoru genová exprese *mmp7*, *mmp9*, *mmp11* snížena, *mmp8* rostla.
- Pomocí metody *in situ* hybridizace byla testována mRNA lokalizace *mmp7* a *mmp9*.
 - Žádná lokalizace *mmp7* a *mmp9* od nebo do rány nebyla pozorována. U nehojících se embryí byla genová exprese *mmp7* a *mmp9* lehce snížena.

7. Literatura

ADIBHATLA, R., HATCHER, J. F. and GUSAIN, A., 2012. Tricyclodecan-9-yl-Xanthogenate (D609) mechanism of actions: A mini-review of literature, *Neurochemical Research*, 37(4):671-9.

AMANO, S., 2009. Possible involvement of basement membrane damage in skin photoaging. *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings*, 14(1):2-7.

AMANO, S., AKUTSU, N. MATSUNAGA, Y., KADOYA, K. NISHIYAMA, T., CHAMPLIAUD, M. F., BURGESSON, R. E, and ADACHI, E., 2001. Importance of balance between extracellular matrix synthesis and degradation in basement membrane formation. *Experimental Cell Research*, 271(2):249-62

ARMSTRONG, D. G., and JUDE, E. B., 2002. The Role of Matrix Metalloproteinases in Wound Healing. *Journal of the American Podiatric Medical Association*, 92(1):12–18.

ARNOLD, K. M, OPDENAKER, L. M, FLYNN, D., and SIMS-MOURTADA J., 2015. Wound Healing and Cancer Stem Cells: Inflammation as a Driver of Treatment Resistance in Breast Cancer. *Cancer Growth and Metastasis*, 8:1-13.

ARTUC, M., HERMES, B., STECKELINGS, U. M., GRÜTZKAU, A. and HENZ, B. M., 1999. Mast cells and their mediators in cutaneous wound healing - Active participants or innocent bystanders? *Experimental Dermatology*, 8(1):1-16.

ARWERT, E. N., HOSTE, E. and WATT, F. M., 2012. Epithelial stem cells, wound healing and cancer. *Nature Reviews Cancer*, 12(3):170-80.

BAKER, A. H., 2002. Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities. *Journal of Cell Science*, 115(19):3719-27.

BALKWILL, F. and MANTOVANI A., 2001. Inflammation and cancer: Back to Virchow? *Lancet*, 357(9255):539-45.

BARBUL, A., BRESLIN, R. J., WOODYARD, J. P., WASSERKRUG, H. L. and EFRON, G., 1989. The effect of in vivo T helper and T suppressor lymphocyte depletion on wound healing. *Annals of Surgery*, 209(4):479-83.

BEANES, S. R., DANG, C., SOO, C., WANG, Y., URATA, M., TING, K., FONKALSRUD, E. W., BENHAIM, P., HEDRICK, M. H., ATKINSON, J. B. and LORENZ, P. H., 2001. Down-regulation of decorin, a transforming growth factor-beta modulator, is associated with scarless fetal wound healing. *Journal of Pediatric Surgery*, 36(11):1666-71.

BECK, C. W., BELMONTE, J. C. I. and CHRISTEN, B. 2009. Beyond early development: *Xenopus* as an emerging model for the study of regenerative mechanisms. *Development Dynamics*, 238(6):1226-48.

BERGERS, G., BREKKEN, R., MCMAHON, G., VU, T. H., ITOH, T., Kazuhiko TAMAKI, K., TANZAWA, K., THORPE, P., ITOHARA, S., WERB, Z. and HANAHAN, D., 2000. Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis. *Nature Cell Biology*, 2(10):737-44.

BOBADILLA, M., SÁINZ, N., RODRIGUEZ, J., ABIZANDA, G., ORBE, J., DE MARTINO, A., VERDUGO, J. G., A. PÁRAMO, J. A., PRÓSPER, F. and PÉREZ-RUIZ, A., 2014. MMP-10 is required for efficient muscle regeneration in mouse models of injury and muscular dystrophy. *Stem Cells*, 32(2):447-61.

BORGGREFE, T. and OSWALD, F., 2009. The Notch signaling pathway: Transcriptional regulation at Notch target genes. *Cell and Molecular Life Sciences*, 66(10):1631-46.

BREW, K., DINAKARPANDIAN, D. and NAGASE, H., 2000. Tissue inhibitors of metalloproteinases: Evolution, structure and function. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1477(1-2):267-83.

- BROUGHTON, G. 2nd, JANIS, J. E. and ATTINGER, C. E., 2006. The basic science of wound healing (reconstructive). *Plastic and Reconstructive Surgery*, 117(7):12-34.
- BULLARD, K. M., LONGAKER, M. T. and LORENZ, H. P., 2003. Fetal wound healing: Current biology. *World Journal of Surgery*, 27(1):54-61.
- BULLARD, K. M., LUND, L., MUDGETT, J. S., MELLIN, T. N., HUNT, T. K., MURPHY, B., RONAN, J., WERB, Z. and BANDA, M. J., 1999. Impaired wound contraction in stromelysin-1-deficient mice. *Annals of Surgery*, 230(2): 260.
- BURKEL, B. M., BENINK, H. A., VAUGHAN, E. M., DASSOW von, G. and BEMENT, W. M., 2012. A Rho GTPase Signal Treadmill Backs a Contractile Array. *Developmental Cell*, 23(2):384-96.
- CAIN, R. J. and RIDLEY, A. J., 2009. Phosphoinositide 3-kinases in cell migration. *Biology of the Cell*, 101(1):13-29.
- CALEY, M. P., MARTINS, V. L. and O'TOOLE, E. A., 2015. Metalloproteinases and Wound Healing. *Advances in Wound Care*, 4(4):225-234.
- CASS, D. L., BULLARD, K. M., SYLVESTER, K. G., YANG, E. Y., LONGAKER, M. T. and ADZICK, N. S., 1997. Wound size and gestational age modulate scar formation in fetal wound repair. *Journal of Pediatric Surgery*, 32(3):411-5.
- CLARK, A. G., MILLER, A. L., VAUGHAN, E., YU, H. Y., PENKERT, R. and BEMENT, W. M., 2009. Integration of Single and Multicellular Wound Responses. *Current Biology*, 19(16):1389-95.
- CLARK, R. A. F., LANIGAN, J. M., DELLAPELLE, P., MANSEAU, E., DVORAK, H. F. and COLVIN, R. B., 1982. Fibronectin and fibrin provide a provisional matrix for epidermal cell migration during wound reepithelialization. *Journal of Investigative Dermatology*, 79(5):264-9.
- COLWELL, A. S., LONGAKER, M. T. and LORENZ, H. P., 2005. Mammalian Fetal Organ Regeneration. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 93:83-100.
- CORDEIRO, J. V. and JACINTO, A., 2013. The role of transcription-independent damage signals in the initiation of epithelial wound healing. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 14(4):249-62.
- CROSBY, L. M. and WATERS, C. M., 2010. Epithelial repair mechanisms in the lung. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology*, 298(6):715-31.
- DANJO, Y. and GIPSON, I. K., 1998. Actin „purse string“ filaments are anchored by E-cadherin-mediated adherens junctions at the leading edge of the epithelial wound, providing coordinated cell movement. *Journal of Cell Science*, 111(22):3323-32.
- DAVIDSON, L. A., EZIN A. M. and KELLER, R., 2002. Embryonic wound healing by apical contraction and ingression in *Xenopus laevis*. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, 53(3):163-76.
- DEGEN, K. E. and GOURDIE, R. G., 2012. Embryonic wound healing: A primer for engineering novel therapies for tissue repair. *Birth Defects Research Part C - Embryo Today*, 96(3):258–270.
- DIECKGRAEFE, B. K., WEEMS, D. M., SANTORO, S. A. and ALPERS, D. H., 1997. ERK and p38 MAP kinase pathways are mediators of intestinal epithelial wound-induced signal transduction. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 233(2):389-94.
- DVORAK, H. F., 1986. Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumors stroma generation and wound healing. *The New England journal of medicine*, 315(26):1650-9.
- EMING, S. A., KRIEG, T. and DAVIDSON, J. M., 2007. Inflammation in wound repair: molecular and cellular mechanisms. *The Journal of Investigative Dermatology*, 127(3):514-25.
- FERGUSON, M. W. J. and O'KANE, S., 2004. Scar-free healing: From embryonic mechanism to adult therapeutic intervention. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 359(1445):839–850.
- FISHER, G. and RITTIÉ, L., 2018. Restoration of the basement membrane after wounding: a hallmark of young human skin altered with aging. *Journal of Cell Communication and Signaling*,

12(1):401–411.

FU, L., DAS, B., MATHEW S. and SHI, Y. B., 2009. Genome-wide identification of *Xenopus* matrix metalloproteinases: Conservation and unique duplications in amphibians. *BMC Genomics*, 10:81.

FUNAMOTO, S., MEILI, R., LEE, S., PARRY, L. and FIRTEL, R. A., 2002. Spatial and temporal regulation of 3-phosphoinositides by PI 3-kinase and PTEN mediates chemotaxis. *Cell*, 109(5):611-23.

FURIE, B. and FURIE, B. C. 2008. Mechanisms of Thrombus Formation. *New England Journal of Medicine*, 359(9):938-49.

GARCÍA-PRIETO, E., GONZÁLEZ-LÓPEZ, A., CABRERA, S., ASTUDILLO, A., GUTIÉRREZ-FERNÁNDEZ, A., FANJUL-FERNÁNDEZ, M., BATALLA-SOLÍS, E., PUENTE, X. S., FUEYO, A., LÓPEZ-OTÍN, C. and ALBAICETA, G. M., 2010. Resistance to bleomycin-induced lung fibrosis in MMP-8 deficient mice is mediated by interleukin-10. *PLoS ONE*, 5(10):13242

GIANNANDREA, M. and PARKS, W. C., 2014. Diverse functions of matrix metalloproteinases during fibrosis. *Disease Models & Mechanisms*, 7:193-203.

GILL, S. E. and PARKS, W. C., 2008. Metalloproteinases and their inhibitors: Regulators of wound healing. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 40(6-7):1334-47.

GODWIN, J. W. and ROSENTHAL, N., 2014. Scar-free wound healing and regeneration in amphibians: Immunological influences on regenerative success. *Differentiation*, 87(1-2):66-75.

GOLDSTEIN, B. and FREEMAN, G., 1997. Axis specification in animal development. *BioEssays*, 19(2):105-16.

GOSIEWSKA, A., YI, C. F., BROWN, L. J., CULLEN, B., SILCOCK, D. and GEESIN, J. C., 2001. Differential expression and regulation of extracellular matrix-associated genes in fetal and neonatal fibroblasts. *Wound Repair and Regeneration*, 9(3):213-22.

GUO, S. and DIPIETRO, L. A., 2010. Critical review in oral biology & medicine: Factors affecting wound healing. *Journal of Dental Research*, 89(3):219–229.

HAMBLETON, P., 1971. Repair of wall damage in *Escherichia coli* recovered from an aerosol. *Journal of general microbiology*, , 69:81-88.

HAN, Y. P., TUAN, T. L., HUGHES, M., WU, H. and GARNER, W. L., 2001. Transforming Growth Factor- β - and Tumor Necrosis Factor- α -mediated Induction and Proteolytic Activation of MMP-9 in Human Skin. *Journal of Biological Chemistry*, 276(25): 22341–22350.

HARALABOPOULOS, G. C., GRANT, D. S., KLIENMAN, H. K., LELKES, P. I., PAPAIOANNO, S. P., MARAGOUDAKI, G. C., 1994. Inhibitors of basement membrane collagen synthesis prevent endothelial cell alignment in matrigel in vitro and angiogenesis in vivo. *Laboratory Investigation*, 71(4):575-82.

HASHMI, S. and MARINKOVICH, M. P., 2011. Molecular organization of the basement membrane zone. *Clinics in Dermatology*, 29(4):398-411.

HOPKINSON-WOOLLEY, J., HUGHES, D., GORDON, S. and MARTIN, P., 1994. Macrophage recruitment during limb development and wound healing in the embryonic and foetal mouse. *Journal of cell science*, 107(5):1159-67.

HOTARY, K., LI, X. Y., ALLEN, E., STEVENS, S. L. and WEISS, S. J., 2006. A cancer cell metalloprotease triad regulates the basement membrane transmigration program. *Genes and Development*, 20(19): 2673–2686.

CHEN, J. W. Y., GRANT, M. E., SCHOR, A. M. and SCHOR, S. L., 1989. Differences between adult and foetal fibroblasts in the regulation of hyaluronate synthesis: correlation with migratory activity. *Journal of Cell Science*, 94:577–584.

CHEN, P. and PARKS, W. C., 2009. Role of matrix metalloproteinases in epithelial migration. *Journal of Cellular Biochemistry*, 108(6):1233-43.

- CHENG, W., YAN-HUA, R., FANG-GANG, N. and GUO-AN, Z., 2010. The content and ratio of type I and III collagen in skin differ with age and injury. *African Journal of Biotechnology*, 10(13), 2524-2529.
- CHRISTEN, B. and SLACK, J. M., 1998. Spatial response to fibroblast growth factor signalling in *Xenopus* embryos. *Development*, 126(1):119-25.
- IHARA, S. and MOTOBAYASHI, Y., 1992. Wound closure in foetal rat skin. *Development*, 114(3):573-82.
- JACOB, A. and PREKERIS R., 2015. The regulation of MMP targeting to invadopodia during cancer metastasis. *Frontiers in cell and developmental biology*, 3:4.
- KHODADOUST, A. A., SILVERSTEIN, A. M., KENYON, K. R. and DOWLING, J. E., 1968. Adhesion of regenerating corneal epithelium. The role of basement membrane. *American Journal of Ophthalmology*, 65(3):339-48.
- KOH, T. J. and DIPIETRO, L. A., 2011. Inflammation and wound healing: the role of the macrophage. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 13:e23.
- KROLL, K. L. and AMAYA, E., 1996. Transgenic *Xenopus* embryos from sperm nuclear transplantations reveal FGF signaling requirements during gastrulation. *Development*, 122(10):3173-83.
- KUDAKA, D. M., ŁODEJ, P. K., BAIER, A. and SZYSZKA, R., 2016. Metalloproteinases of the extracellular matrix and their inhibitors. *BioTechnologia*, 97(2):129-136.
- KURKINEN, M., VAHERI, A., ROBERTS, P. J. and STENMAN, S., 1980. Sequential appearance of fibronectin and collagen in experimental granulation tissue. *Laboratory Investigation*, 43(1):47-51.
- LANDÉN, N. X., LI, D. and STÅHLE, M., 2016. Transition from inflammation to proliferation: a critical step during wound healing. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 73(20):3861-85.
- LANE, A., 1986. Human Fetal Skin Development. *Pediatric Dermatology*, 3(6):487-91.
- LARSON, B. J., LONGAKER, M. T. and LORENZ, H. P., 2010. Scarless fetal wound healing: A basic science review. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 126(4):1172-80.
- LE, H., KLEINERMAN, R., LERMAN, O. Z., BROWN, D., GALIANO, R., GURTNER, G. C., WARREN, S. M., LEVINE, J. P. and SAADEH, P. B., 2008. Hedgehog signaling is essential for normal wound healing. *Wound Repair and Regeneration*, 16(6):768-73.
- LEBLEU, V. S., MACDONALD, B. and KALLURI, R., 2007. Structure and function of basement membranes. *Experimental Biology*, 232(9):1121-9.
- LEVIN, D. E., 2005. Cell Wall Integrity Signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 69(2):262-91.
- LEWIS, J., 1998. Notch signalling and the control of cell fate choices in vertebrates. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 9(6):583-9.
- LI, J., ZHANG, S., SOTO, X., WOOLNER, S. and AMAYA, E., 2013. ERK and phosphoinositide 3-kinase temporally coordinate different modes of actin-based motility during embryonic wound healing. *Journal of Cell Science*, 126(21):5005-17.
- LI, J., Juan CHEN, J. and KIRSNER, R., 2007. Pathophysiology of acute wound healing. *Clinics in Dermatology*, 25(1):9-18.
- LI, S., QI, Y., MCKEE, K., LIU, J., HSU, J. and YURCHENCO, P. D., 2017. Integrin and dystroglycan compensate each other to mediate laminin-dependent basement membrane assembly and epiblast polarization. *Matrix Biology*, 57-58:272-284.
- LIECHTY, K. W., KIM, H. B., ADZICK, N. S. and CROMBLEHOLME, T. M., 2000. Fetal wound repair results in scar formation in interleukin-10-deficient mice in a syngeneic murine model of scarless fetal wound repair. *Journal of Pediatric Surgery*, 35(6):866-73.

- LIN, G., CHEN, Y. and SLACK, J. M. W., 2013. Imparting Regenerative Capacity to Limbs by Progenitor Cell Transplantation. *Developmental Cell*, 24(1):41-51.
- LINSELL, C. E., J. SHAWBER, C. J., BOULTER, J. and WEINMASTER, G., 1995. Jagged: A mammalian ligand that activates notch1. *Cell*, 80(6):909-17.
- LINT van, P. and LIBERT, C., 2007. Chemokine and cytokine processing by matrix metalloproteinases and its effect on leukocyte migration and inflammation. *Journal of Leukocyte Biology*, 82(6):1375-81.
- LORENZ, H. P. and N S ADZICK, N. S., 1993. Scarless skin wound repair in the fetus. *The Western Journal of Medicine*, 159(3):350-5.
- LU, P., WEAVER, V. M. and WERB, Z., 2012. The extracellular matrix: A dynamic niche in cancer progression. *The Journal of Cell Biology*, 196(4):395-406.
- MAKHLOUF, G. M. and MURTHY, K. S., 1997. Signal transduction in gastrointestinal smooth muscle. *Cellular Signalling*, 9(3-4):269-76.
- MANUEL, J. A. and GAWRONSKA-KOZAK, B., 2006. Matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) is upregulated during scarless wound healing in athymic nude mice. *Matrix Biology*, 25(8):505-14.
- MARAGOUidakis, M. E., MISSIRLIS, E., KARAKIULAKIS, G. D., SARMONICA, M., BASTAKIS, M. and TSOPANOGLIOU, N., 1993. Basement membrane biosynthesis as a target for developing inhibitors of angiogenesis with anti-tumor properties. *Kidney International*, 43(1):147-50.
- MARGADANT, C. and SONNENBERG, A., 2010. Integrin-TGF- β crosstalk in fibrosis, cancer and wound healing. *EMBO Reports*, 11(2):97-105.
- MARTIN, P. and Parkhurst S. M., 2004. Parallels between tissue repair and embryo morphogenesis. *Development*, 131(13):3021-34.
- MARTIN, P. and LEIBOVICH, S. J., 2005. Inflammatory cells during wound repair: The good, the bad and the ugly. *Trends in Cell Biology*, 15(11):599-607.
- MARTIN, P. and LEWIS, J., 1992a. Actin cables and epidermal movement in embryonic wound healing. *Nature*, 360:179-183.
- MARTINS, V. L., CALEY, M. and O'TOOLE, E. A., 2012. Matrix metalloproteinases and epidermal wound repair. *Cell and tissue research*, 351(2):255-68.
- MAST, B. A., DIEGELMANN, R. F., KRUMMEL, T. M. and COHEN, I. K., 1993. Hyaluronic Acid Modulates Proliferation, Collagen and Protein Synthesis of Cultured Fetal Fibroblasts. *Matrix*, 13(6):441-6
- MAST, B. A., FLOOD, L. C., HAYNES, J. H., DEPALMA, R. L., COHEN, I. K., DIEGELMANN, R. F. and KRUMMEL, T. M., 1991. Hyaluronic Acid is a Major Component of the Matrix of Fetal Rabbit Skin and Wounds: Implications for Healing by Regeneration. *Matrix*, 11(1):63-8.
- MATTESON, D. M., SHEN, D. F. and CHAN, C. C., 1999. Inhibition of experimental melanin protein-induced uveitis (EMIU) by targeting nitric oxide via phosphatidylcholine-specific phospholipase C. *Journal of Autoimmunity*, 13(2):197-204.
- MCCAWLEY, L. J. and MATRISIAN, L. M., 2001. Matrix metalloproteinases: They're not just for matrix anymore! *Current Opinion in Cell Biology*, 13(5):534-40.
- MCCLUSKEY, J. and MARTIN, P., 1995. Analysis of the Tissue Movements of Embryonic Wound Healing-Dil Studies in the Limb Bud Stage Mouse Embryo. *Developmental Biology*, 170(1):102-14.
- MCGUIRE, J. K., LI, Q. and PARKS, W. C. 2003. Matrilysin (matrix metalloproteinase-7) mediates E-cadherin ectodomain shedding in injured lung epithelium. *American Journal of Pathology*, 162(6):1831-1843.
- MENKE, N. B., WARD, K. R., WITTEN, T. M., BONCHEV, D. G. and DIEGELMANN, F., 2007. Impaired wound healing. *Clinics in Dermatology*, 25(1):19-25.

- MERKER, H., 1994. Morphology of the basement membrane. *Microscopy Research and Technique*, 28(2):95-124.
- MERLOT, S., 2003. Leading the way: directional sensing through phosphatidylinositol 3-kinase and other signaling pathways. *Journal of Cell Science*, 116(17):3471-8.
- MINER, J. H., 2004. Compositional and structural requirements for laminin and basement membranes during mouse embryo implantation and gastrulation. *Development*, 131(10):2247-56.
- MINER, J. H., 2012. The glomerular basement membrane. *Experimental Cell Research*, 318(9):973-8.
- MOULIN, V., LAWNY, F., BARRITAU, D. and CARUELLE, J. P., 1998. Platelet releasate treatment improves skin healing in diabetic rats through endogenous growth factor secretion. *Cellular and molecular biology*, 44(6):961-71.
- MOVAHEDAN, A., MAJDI, M., AFSHARKHAMSEH, N., SAGHA, H. M., SAADAT, N. S., SHALILEH, K., MILANI, B. Y., YING, H. and DJALILIAN, A. R., 2012. Notch inhibition during corneal epithelial wound healing promotes migration. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 53(12):7476-83.
- MULLER, M., TROCME, C., LARDY, B., MOREL, F., HALIMI, S. and BENHAMOU, P. Y., 2008. Matrix metalloproteinases and diabetic foot ulcers: The ratio of MMP-1 to TIMP-1 is a predictor of wound healing. *Diabetic Medicine*, 25(4):419-26.
- MURPHY, G. J. P., MURPHY, G. and REYNOLDS, J. J., 1991. The origin of matrix metalloproteinases and their familial relationships. *FEBS Letters*, 289(1):4-7.
- NATHAN, C., 2002. Points of control in inflammation. *Nature*, 420(6917):846-52.
- NGUYEN, T. T., MOBASHERY, S. and CHANG M., 2016. *Wound Healing - New insights into Ancient Challenges*, Vlad Adrian Alexandrescu, IntechOpen.
- NIEUWKOOP P., Faber J., 1994. Normal Table of *Xenopus Laevis* (Daudin): A Systematical & Chronological Survey of the Development from the Fertilized Egg till the End of Metamorphosis. Garland Publishing Inc, New York.
- NOBES, C. D. and HALL, A., 1995. Rho, Rac, and Cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell*, 81(1):53-62.
- NWOMEH, B. C., LIANG, H. X., COHEN, I. K. and YAGER, D. R., 1999. MMP-8 is the predominant collagenase in healing wounds and nonhealing ulcers. *Journal of Surgical Research*, 81(2):189-95.
- OKUSE, T., CHIBA, T., KATSUUMI, I. and IMAI, K., 2005. Differential expression and localization of WNTs in an animal model of skin wound healing. *Wound Repair and Regeneration*, 13(5):491-7.
- OLUTOYE, O. O., YAGER, D. R., COHEN, I. K. and DIEGELMANN, R. F., 1996. Lower cytokine release by fetal porcine platelets: A possible explanation for reduced inflammation after fetal wounding. *Journal of Pediatric Surgery*, 31(1):91-95.
- PARKS, W. C., 1999. Matrix metalloproteinases in repair. *Wound Repair and Regeneration*, 7(6):423-32.
- PARKS, W. C., WILSON, C. L. and LÓPEZ-BOADO, Y. S., 2004. Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity. *Nature Reviews. Immunology*, 4(8):617-29.
- PEI, D. and WEISS, S. J., 1995. Furin-dependent intracellular activation of the human stromelysin-3 zymogen. *Nature*, 375(6528):244-7.
- POLLARD, T. D. and BORISSY, G.G., 2003. Cellular Motility Driven by Assembly and Disassembly of Actin Filaments. *Cell*, 112(4):453-465.

- POSCHL, E., 2004. Collagen IV is essential for basement membrane stability but dispensable for initiation of its assembly during early development. *Development*, 131(7):1619-28.
- RAMOS-LEWIS, W., LAFEVER, K. S. and PAGE-MCCAW, A., 2018. A scar-like lesion is apparent in basement membrane after wound repair in vivo. *Matrix Biology*, 74:101-120.
- RAZZELL, W., WOOD, W. and MARTIN, P., 2014. Recapitulation of morphogenetic cell shape changes enables wound re-epithelialisation. *Journal of Cell Sciences*, 141: 1814-1820.
- REDD, M. J., COOPER, L., WOOD, W., STRAMER, B. and MARTIN, P., 2004. Wound healing and inflammation: Embryos reveal the way to perfect repair. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 359(1445):777-784.
- REISS, M. J., HAN, Y. P., GARCIA, E., GOLDBERG, M., YU, H. and GARNER, W. L., 2010. Matrix metalloproteinase-9 delays wound healing in a murine wound model. *Surgery*, 147(2):295-302.
- REN, Y. H., GU, G. S., MIN, Y. and DRIVER, V. R., 2014. Role of matrix metalloproteinases in chronic wound healing: Diagnostic and therapeutic implications. *Chinese Medical Journal*, 127(8):1572-81.
- RIDLEY, A. J. and HALL, A., 1992. The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell*, 70(3):389-99.
- ROHANI, M. G. and PARKS, W. C., 2015. Matrix remodeling by MMPs during wound repair. *Matrix Biology*, 44-46:113-21.
- ROSS, R. and G. ODLAND, 1968. Human wound repair. II. Inflammatory cells, epithelial-mesenchymal interrelations, and fibrogenesis. *The Journal of cell biology*, 39(1): 152-168.
- ROZARIO, T. and DESIMONE, D. W., 2010. *The extracellular matrix in development and morphogenesis: A dynamic view*, 341(1):126-40.
- RUIZ I ALTABA, A., SÁNCHEZ, P. and DAHMANE, N., 2002. Gli and hedgehog in cancer: tumours, embryos and stem cells. *Nature Reviews Cancer*, 2(5):361-72.
- SAARIALHO-KERE, U. K., KOVACS, S. O., PENTLAND, A. P., OLERUD, J. E., WELGUS, H. G. and PARKS, W. C., 1993. Cell-matrix interactions modulate interstitial collagenase expression by human keratinocytes actively involved in wound healing. *Journal of Clinical Investigation*, 92(6): 2858-2866.
- SABINO, F. and AUF DEM KELLER, U., 2015. Matrix metalloproteinases in impaired wound healing. *Metalloproteinases In Medicine*, 2:1-8.
- SEGER, R. and KREBS, E. G., 1995. The MAPK signaling cascade. *The FASEB Journal*, 9(9):726-35.
- SESSION, A. M., UNO, Y., KWON, T., CHAPMAN, J. A., TOYODA, A., TAKAHASHI, S., FUKUI, A., HIKOSAKA, A., SUZUKI, A., KONDO, M., J. HEERINGEN van, S. J., QUIGLEY, I., HEINZ, S., OGINO, H., OCHI, H., HELLSTEN, U., LYONS, J. B., SIMAKOV, O., PUTNAM, N., STITES, J., KUROKI, Y., TANAKA, Y., MICHIE, T., WATANABE, M., BOGDANOVIC, O., LISTER, R., GEORGIOU, G., PARANJPE, S. S., KRUIJSBERGEN van, I., SHU, S., CARLSON, J., KINOSHITA, T., OHTA, Y., MAWARIBUCHI, S., JENKINS, J., GRIMWOOD, J., SCHMUTZ, J., MITROS, T., MOZAFFARI, S., SUZUKI, Y., HARAMOTO, Y., YAMAMOTO, T. S., TAKAGI, C., HEALD, R., MILLER, K., HAUDENSCHILD, C., KITZMAN, J., NAKAYAMA, T., IZUTSU, Y., ROBERT, J., FORTRIEDE, J., BURNS, K., LOTAY, V., KARIMI, K., YASUOKA, Y., DICHMANN, D. S., FLAJNIK, M. F., HOUSTON, D. W., SHENDURE, J., DUPASQUIER, L., VIZE, D., ZORN, A. M., ITO, M., MARCOTTE, E. M., WALLINGFORD, J. B., ITO, Y., ASASHIMA, M., UENO, N., MATSUDA, Y., VEENSTRA, G. J. C., FUJIYAMA, A., HARLAND, M., TAIRA, M. and. ROKHSAR, D. S., 2016. Genome evolution in the allotetraploid frog *Xenopus laevis*. *Nature*, 538:336-343.
- SHUM, J. K S, ANDRES MELENDEZ J. and JEFFREY, J. J., 2002. Serotonin-induced MMP-13 production is mediated via phospholipase C, protein kinase C, and ERK1/2 in rat uterine smooth muscle

cells. *Journal of Biological Chemistry*, 277(45):42830-40.

SCHÄFER, M. and WERNER, S., 2008. Cancer as an overhealing wound: An old hypothesis revisited. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 9(8):628-38.

SCHULTZ, G. S. and WYSOCKI, A., 2009. Interactions between extracellular matrix and growth factors in wound healing. *Wound Repair and Regeneration*, 17(2):153-62.

SILLER-LÓPEZ, F., SANDOVAL, A., SALGADO, S., SALAZAR, A., BUENO, M. GARCIA, J., VERA, J., GÁLVEZ, J., HERNÁNDEZ, I., RAMOS, M., AGUILAR-CORDOVA, E. and ARMENDARIZ-BORUNDA, J., 2004. Treatment with Human Metalloproteinase-8 Gene Delivery Ameliorates Experimental Rat Liver Cirrhosis. *Gastroenterology*, 126(4):1122-33.

SIM, H. J., KIM, S. H., MYUNG, K. J., KWON, T., LEE, H. S. and PARK, T. J., 2018. *Xenopus*: An alternative model system for identifying muco-active agents. *PLoS ONE*, 13(2):e0193310.

SINDRILARU, A., PETERS, T., WIESCHALKA, S., BAICAN, C., BAICAN, A., PETER, H., HAINZL, A., SCHATZ, S., QI, Y., SCHLECHT, A., WEISS, J. M., WLASCHEK, M., SUNDERKÖTTER, C. and SCHARFFETTER-KOCHANKE, K. 2011. An unrestrained proinflammatory M1 macrophage population induced by iron impairs wound healing in humans and mice. *Journal of Clinical Investigation*, 121(3):985-97.

SINGER, A. J. and CLARK, R. A., 1999. Cutaneous wound healing. *The New England Journal of Medicine*, 341(10):738-46.

SIRES, U. I., GRIFFIN, G. L., BROEKELMANN, T. J., MECHAM, R. P., MURPHY, G., CHUNG, A. E., WELGUS, H. G. and SENIOR, R. M., 1993. Degradation of entactin by matrix metalloproteinases. Susceptibility to matrilysin and identification of cleavage sites. *Journal of Biological Chemistry*, 268(3):2069-74.

SMOLA, H., THIEKOTTER, G. and FUSENIG, N. E., 1993. Mutual induction of growth factor gene expression by epidermal-dermal cell interaction. *Journal of Cell Biology*, 122(2):417-29.

SMYTH, N., VATANSEVER, S. H., MURRAY, P., MEYER, M., FRIE, C., PAULSSON, M. and EDGAR, D., 1999. Absence of basement membranes after targeting the LAMC1 gene results in embryonic lethality due to failure of endoderm differentiation. *Journal of Cell Biology*, 144(1):151-160.

SONNEMANN, K. J. and BEMENT, W. M., 2011. Wound Repair: Toward Understanding and Integration of Single-Cell and Multicellular Wound Responses. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 27(1):237-263.

SOO, C., BEANES, S. R., HU, F. Y., ZHANG, X., DANG, C., CHANG, G., WANG, Y., NISHIMURA, I., FREYMILLER, E., LONGAKER, M.T., LORENZ, H.P. and TING, K., 2003. Ontogenetic Transition in Fetal Wound Transforming Growth Factor-(β) Regulation Correlates with Collagen Organization. *American Journal of Pathology*, 163(6):2459-76.

SOO, C., HU, F. Y., ZHANG, X., WANG, Y., BEANES, S. R., LORENZ, H. P., HEDRICK, M. H., MACKOOL, R. J., PLAAS, A., KIM, S. J., LONGAKER, M. T., FREYMILLER, E. and TING, K., 2000. Differential expression of fibromodulin, a transforming growth factor- β modulator, in fetal skin development and scarless repair. *American Journal of Pathology*, 157(2):423-33.

STANISSTREET, M., Jennifer WAKELY, J. and ENGLAND, M. A., 1980. Scanning electron microscopy of wound healing in *Xenopus* and chicken embryos. *Journal of embryology and experimental morphology*, 59:341-53

STANISSTREET, M., 1982. Calcium and wound healing in *Xenopus* early embryos, *Journal of embryology and experimental morphology*, 67:195-205.

STANLEY, J. R., ALVAREZ, O. M., BERE, E. W., EAGLSTEIN, W. H. and KATZ, S. I., 1981. Detection of basement membrane zone antigens during epidermal wound healing in pigs. *Journal of Investigative Dermatology*, 77(2):240-243.

SUNDARAM, G. M., QUAH, S. and SAMPATH, P., 2018. Cancer: the dark side of wound healing.

The FEBS Journal, 285:4516–453.

SUZUKI, K. T., ISOYAMA, Y., KASHIWAGI, K., SAKUMA, T., OCHIAI, H., SAKAMOTO, N., FURUNO, N., KASHIWAGI, A. and YAMAMOTO, T., 2013. High efficiency TALENs enable F0 functional analysis by targeted gene disruption in *Xenopus laevis* embryos. *Biology Open*, 2(5):448-452.

SZUBINSKA, B., 1971. “New membrane” formation in amoeba proteus upon injury of individual cells: Electron microscope observations. *Journal of Cell Biology*, 49(3): 747–772.

TANJORE, H. and KALLURI, R., 2006. The Role of Type IV Collagen and Basement Membranes in Cancer Progression and Metastasis. *The American Journal of Pathology*, 168(3):715-717.

THIRUVOTH, F. M., MOHAPATRA, D. P., SIVAKUMAR, D. K., CHITTORIA, R. K. and NANDHAGOPAL, V., 2015. Current concepts in the physiology of adult wound healing. *Plastic and Aesthetic Research*, 2:250-6.;

TOMANKOVA, S., ABAFFY, P. and SINDELKA, R., 2017. The role of nitric oxide during embryonic epidermis development of *Xenopus laevis*. *Biology Open*, 6(6): 862–871.

VELNAR, T., BAILEY, T. and SMRKOLJ, V., 2009. The Wound Healing Process : an Overview of the Cellular and Molecular Mechanisms. *The Journal of International Medical Research*. 37(5),1528-1542.

VILLONE, D., FRITSCH, A., KOCH, M., BRUCKNER-TUDERMAN, L., HANSEN, U. and BRUCKNER, P., 2008. Supramolecular interactions in the dermo-epidermal junction zone: Anchoring fibril-collagen VII tightly binds to banded collagen fibrils. *Journal of Biological Chemistry*, 283(36): 24506–24513.

VIRCHOW, R., 1858. Die Cellularpathologie in ihrer Begründung auf physiologische und pathologische Gewebelehre. *Verlag von August Hirschfeld*, Berlin.

VOLKMANN, D. and BALUŠKA, F., 1999. Actin cytoskeleton in plants: From transport networks to signaling networks. *Microscopy Research and Technique*, 47(2):135-154

WATKINS, D. N., BERMAN, D. M., BURKHOLDER, S. G., WANG, B., BEACHY, P. A. and BAYLIN, S. B., 2003. Hedgehog signalling within airway epithelial progenitors and in small-cell lung cancer. *Nature*, 422(6929):313-7.

WELCH, M. P., ODLAND, G. F. and CLARK, R. A. F., 1990. Temporal relationships of F-actin bundle formation, collagen and fibronectin matrix assembly, and fibronectin receptor expression to wound contraction. *Journal of Cell Biology*, 110(1):133–145.

WERB, Z., INADA, M., FUEYO, A., ASTUDILLO, A., HIRATA, M., LÓPEZ-OTÍN, C., PUENTE, X. S., GUTIÉRREZ-FERNÁNDEZ, A., SHAPIRO, S. D., PITIOT, A. S., BALBÍN, M., HIROSE, K., NOËL, A. and KRANE, S. M., 2007. Increased inflammation delays wound healing in mice deficient in collagenase-2 (MMP-8). *The FASEB Journal*. 21(10):2580-91.

WHITBY, D. J. and FERGUSON, M. W. J., 1991. Immunohistochemical localization of growth factors in fetal wound healing. *Developmental Biology*, 147(1):207-215.

WITTE, M. B. and BARBUL, A., 2002. Role of nitric oxide in wound repair. *American Journal of Surgery*, 183(4):406-12.

WOJTOWICZ, A. M., OLIVEIRA, S., CARLSON, M.W., ZAWADZKA, A., ROUSSEAU, C. F. and BAKSH, D., 2014. The importance of both fibroblasts and keratinocytes in a bilayered living cellular construct used in wound healing. *Wound repair and regeneration*, 22(2):246-55.

WOOD, W., ACINTO, A., GROSE, R., WOOLNER, S., GALE, J., WILSON, C. and Paul MARTIN, P., 2002. Wound healing recapitulates morphogenesis in *Drosophila* embryos. *Nature Cell Biology*, 4(11):907-12.

WYSOCKI, A. B., STAIANO-COICO, L. and GRINNELL, F., 1993. Wound fluid from chronic leg ulcers contains elevated levels of metalloproteinases MMP-2 and MMP-9. *Journal of Investigative*

Dermatology, 101(1):64-8.

XU, S., HSIAO, T. and CHISHOLM, A., 2012. The wounded worm: Using *C. elegans* to understand the molecular basis of skin wound healing. *Worm*, 1(2):134-8.

XUE, M. and JACKSON, C., 2013. Extracellular Matrix Reorganization During Wound Healing and Its Impact on Abnormal Scarring. *Advances in Wound Care*, 4(3):119-136.

YAN, C. and BOYD, D. D., 2007. Regulation of matrix metalloproteinase expression expression. *Journal of Cell Physiology*, 211(1):19-26.

YAN, L., BORREGAARD, N., KJELDSEN, L. and MOSES, M. A., 2001. The high molecular weight urinary matrix metalloproteinase (MMP) activity is a complex of gelatinase B/MMP-9 and neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL): Modulation of MMP-9 activity by NGAL. *Journal of Biological Chemistry*, 276(40):37258-65.

YANG, C. C., LIN, S. D. and YU, H. S., 1997. Effect of growth factors on dermal fibroblast contraction in normal skin and hypertrophic scar. *Journal of Dermatological Science*, 14(2):162-169.

YOKOYAMA, H., MARUOKA, T., ARUGA, A., AMANO, T., OHGO, S., SHIROISHI, T. and TAMURA, K., 2011. Prx-1 expression in *xenopus laevis* scarless skin-wound healing and its resemblance to epimorphic regeneration. *Journal of Investigative Dermatology*, 131(12):2477-2485.

YOSHII, Y., NODA, M., MATSUZAKI, T. and IHARA, S., 2005. Wound healing ability of *Xenopus laevis* embryos. I. Rapid wound closure achieved by bisectional half embryos. *Development Growth and Differentiation*, 47(8):553-561.

ZHANG, L., SHIMIZU, S. and TSUJIMOTO, Y., 2005. Two distinct Fas-activated signaling pathways revealed by an antitumor drug D609. *Oncogene*, 24(18):2954-62.

ZUIJLEN von, P. P. M., RUURDA, J. J. B., VEEN van, H. A., MARLE van, J., TRIER van, A. J. M., GROENEVELT, F., KREIS, R. W. and MIDDELKOOP, E., 2003. Collagen morphology in human skin and scar tissue: no adaptations in response to mechanical loading at joints. *Burns*, 29(5):423-31.

8. Přílohy

3.7 Příloha 1: Používané primery pro RT-qPCR analýzu navrhnuté na rozhraní intron/exon pomocí

Primer-BLAST

Cílený gen	Forward/reverse sekvence	Délka produktu [bp]
<i>mmp1.S</i>	F: CCCCAGCAACAAAGGAAGAA R: TCCCCCATCAGTTCCAAGAC	138
<i>mmp2.S</i>	F: AGTTTCAAGGCAACACATACAACA R: CATAGTTTTCCATCACTGCGACC	235
<i>mmp3.L</i>	F: AACAAATGGACGTTGGGACCT R: GGGGTCGTTGGAATGAGACA	95
<i>mmp7.L</i>	F: GTGGAGTTTTAGCTCACGCC R: TCAAGTCCCAGAGAATGACCAA	148
<i>mmp8.S</i>	F: CCAGGTGTTCCAAACAAGGT R: CGCAAGACTCTCTTCTTCGTT	110
<i>mmp9.S</i>	F: GTCACACCTCTGTCCTTCACTC R: GTCACACCTCTGTCCTTCACTC	117
<i>mmp11.L</i>	F: ACTTACCTTCAGCACAGAATCCA R: GTGAGCATTGAGCAGTCCCT	105
<i>mmp13.S</i>	F: CCGCACATTTGCAGAGACTT R: CCCTGTCACCGACATTCCAA	118
<i>mmp14.L</i>	F: GCTACCAGATGATGACCGCA R: TTTGTGTGGGTCGCGGAG	110
<i>mmp15.L</i>	F: CAAGACTTCTGCTGCTGGGA R: GCATGGTGGACATCTGACGA	147
<i>mmp16.L</i>	F: TGGAAACAGACAACTTCAAGCTAC R: AGGAACAGAACGGTGTGGTG	128
<i>mmp19.L</i>	F: TCTGGAAAGGAGGCCAAGAG R: AGTGGGTCGATACCTGGAAAA	130
<i>mmp25.L</i>	F: GCGTCCTCCCGCCAC R: AACGCTTCTCCTCGGATGTT	103
<i>mmp28.L</i>	F: ATAGTGGAACAGCTTGCATC R: CAATATCCTTCACGCCACATC	129
<i>mrpl1</i>	F:GCTTAAACTAGACATGAAGCTGGAA R:TGGGACAATTTCAAGGTGTTGC	127

3.8 Příloha 2: Testovací qPCR s geny *rfl1* a *spike*

GEN	<i>rfl1</i>			<i>spike</i>		
Podmínka	Cq	St-Dev	Geomean	Cq	St-Dev	Geomean
0 min A D609	35.09	0.601	1	23.91	0.237	1
0 min B D609	33.33			24.54		
0 min C D609	33.95			24.37		
0 min WT	32.37	X	X	23.43	X	X
30 min A D609	33.45	0.165	1.557	25.39	0.115	0.471
30 min B D609	33.35			25.00		
30 min C D609	33.65			25.69		
30 min WT	33.99	X	X	25.76	X	X
60 min A D609	32.76	1.790	3.885	25.88	0.169	0.179
60 min B D609	32.22			28.62		
60 min C D609	31.52			25.77		
60 min WT	33.13	X	X	26.07	X	X
90 min A D609	32.75	2.322	2.748	25.71	0.100	0.369
90 min B D609	31.57			25.33		
90 min C D609	33.67			26.10		
90 min WT	32.50	X	X	25.74	X	X
180 min A D609	33.68	0.682	0.375	25.90	0.103	0.298
180 min B D609	34.13			25.58		
180 min C D609	38.80			26.59		
180 min WT	31.78	X	X	25.29	X	X
360 min A D609	34.08	0.410	1.024	25.69	0,465	0.379
360 min B D609	33.53			25.84		
360 min C D609	34.66			25.49		
360 min WT	30.53	X	X	25.62	X	X

3.9 Příloha 3: Záznam hojení v reálném čase (přiložené CD)